

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Untersuchung der Rolle von maternalen Antikörpern in der
Ausbildung einer Immunantwort im Haushuhn**

von Antonina Anna Martha Schlickenrieder
aus Friedberg

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Angefertigt am Wissenschaftszentrum Weihenstephan,
Professur für Biotechnologie der Reproduktion, TU München

Mentor: Prof. Dr. Benjamin Schusser

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Elisabeth G. Kemter

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Meinen Liebsten.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1.	Grundlagen der B-Zell Entwicklung im Huhn	3
2.1.1.	Präbursale Schritte der B-Zell Entwicklung	4
2.1.2.	Die Bursa als zentrales Organ der B-Zell Entwicklung.....	4
2.1.3.	Postbursale Phase der B-Zellen und Affinitätsreifung	6
2.2.	Antikörper als Teil der erworbenen Immunantwort	8
2.2.1.	Aufbau und Einteilung von Immunglobulinen.....	8
2.2.2.	Entstehung und Vielfalt des Antikörperrepertoires	10
2.2.3.	<i>In vivo</i> Knockout von schwerer und leichter Immunglobulinkette	12
2.3.	Maternale Antikörper	14
2.3.1.	Übertragung und Aufnahme der maternalen Antikörper	15
2.3.2.	Interferenzen von Vakzinen mit maternalen Antikörpern	16
2.3.3.	Maternale Antikörper im Huhn	17
2.3.4.	Studien zur Wirkung von maternalen Antikörper	18
3.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
4.	MATERIAL UND METHODEN	22
4.1.	Tiere und Tierhaltung	22
4.1.1.	Herkunft und Zucht.....	22
4.1.2.	Inkubation von Eiern und Schlupf der Küken.....	22
4.2.	Probenname und Immunisierung	23
4.2.1.	Embryonale Blutentnahme.....	23
4.2.2.	Blutentnahme am geschlüpften Tier.....	25
4.2.3.	Immunisierung mit Keyhole limpet hemocyanin	25
4.2.4.	Organentnahme.....	26
4.2.4.1.	Organentnahme für histologische Proben	26
4.2.4.2.	Präparation von Organen zur Gewinnung von RNA.....	26
4.3.	Isolation genomischer DNA aus Hühnerblut.....	27
4.4.	RNA Isolation aus verschiedenen embryonalen Geweben	28
4.4.1.	RNA Isolation aus der Cäcaltonsille.....	28

4.4.2.	RNA Isolation aus PBMCs	28
4.5.	cDNA Synthese.....	29
4.6.	Polymerase Kettenreaktion	30
4.6.1.	Genotypisierungs-PCRs	30
4.6.2.	Geschlechtsbestimmung per PCR	32
4.6.3.	Amplifikation der variablen Region von Immunglobulinen	33
4.7.	Agarose-Gelelektrophorese	35
4.8.	Aufreinigung des PCR-Amplikons.....	36
4.9.	Isolation von Leukozyten.....	37
4.9.1.	Isolation von PBMCs aus peripherem Blut.....	37
4.9.2.	Gewinnung von Leukozyten aus der Milz	38
4.9.3.	Isolation von Leukozyten aus der Bursa.....	38
4.10.	Isolation von IgY aus dem Eidotter	39
4.11.	qRT-PCR auf die Expression von IgA	40
4.12.	Magnetischer Sort von B-Zellen (MACS).....	42
4.13.	Durchflusszytometrie.....	43
4.14.	ELISA.....	46
4.14.1.	Immunglobulin-Nachweis.....	46
4.14.2.	Nachweis von anti-KLH Antikörpern.....	49
4.15.	Histologie.....	49
4.15.1.	Anfertigung histologischer Schnitte	49
4.15.2.	Hämatoxylin-Eosin Färbung	50
4.15.3.	Immunhistologie.....	50
4.16.	Prozessierung der Next-Generation-Sequencing Daten	52
4.17.	Statistische Auswertung	52
5.	ERGEBNISSE.....	53
5.1.	Generierung von JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren	53
5.1.1.	Anpaarungsstrategie	53
5.1.2.	Genotypisierung der JH ^{-/-} IgL ^{-/-} Tiere.....	54
5.1.3.	Durchflusszytometrie der JH ^{-/-} IgL ^{-/-} Tiere	55

5.1.4.	Histologie der Bursa	56
5.1.5.	Etablierung des B-Zell Sorts für RNA Sequenzierungsanalysen	60
5.2.	Analyse des Fehlens von maternalen Antikörpern auf die Entwicklung von Küken	62
5.2.1.	Einteilung der Versuchsgruppen	62
5.2.2.	Bestätigung des Phänotyps der Elterntiere.....	63
5.2.2.1.	Fehlen von Antikörpern bei JH ^{-/-} Tieren.....	63
5.2.2.2.	Fehlen von IgY im Dotter von weiblichen JH ^{-/-} Hennen	64
5.2.3.	Anpassung der Versuchsgruppen	64
5.2.3.1.	Genotypisierung aller Tiere im Versuch.....	64
5.2.3.2.	Sexing der Tiere	65
5.2.4.	Verringerte Gewichtszunahme der Versuchsgruppe	66
5.2.4.1.	Gewicht der Versuchstiere	66
5.2.4.2.	Zunahmen der Tiere.....	68
5.2.5.	Durchflusszytometrische Analyse der PBMCs	70
5.2.6.	Vergleich der Antikörperproduktion im Blutplasma.....	72
5.2.7.	IgA Expression in der Cäcaltonsille	80
5.2.8.	Immunisierung mit KLH.....	80
5.2.8.1.	Keine Detektion von KLH spezifischen Antikörpern vor Immunisierung.....	80
5.2.8.2.	Verlauf der anti-KLH spezifischen Immunglobulintiter nach Immunisierung.....	81
5.3.	Analyse des Antikörperrepertoires im Haushuhn	84
5.3.1.	Amplifikation der variablen Region der Immunglobuline.....	84
5.3.2.	Auswertung der NGS-Daten mit FastQC	86
6.	DISKUSSION.....	90
6.1.	Besiedelung der Bursa durch B-Zellen in JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren.....	90
6.1.1.	Phänotyp der JH ^{-/-} IgL ^{-/-} Tiere	90
6.1.2.	Verbleib des V _H zu D _H Rearrangements in JH-KO Tieren.....	92
6.1.3.	Etablierung des B-Zell Sorts als Voraussetzung für die RNA- Sequenzierung der embryonalen Zellen.....	93
6.2.	Vergleich von Küken ohne maternale Antikörper zu Küken mit maternalen Antikörpern.....	94

6.2.1.	Bestmögliche Voraussetzung zur Deletion der maternalen Antikörper durch JH-KO Tiere	94
6.2.2.	Nachweis des Fehlens der maternalen Antikörper in der Versuchsgruppe	95
6.2.3.	Das Fehlen von maternalen Antikörpern führt zu höheren IgM sowie niedrigeren IgY Titern	96
6.2.4.	Keine Beeinträchtigung der Ausbildung der Immunantwort auf KLH durch maternale Antikörper	98
6.2.5.	Erhöhter Energieverbrauch für Immunantworten bei Tieren ohne maternale Antikörper	99
6.2.6.	Maternal Antikörper negative Tiere zeigen verminderte T-Zell-Zahlen im Blut	99
6.2.7.	Zusammenfassung der Erkenntnisse von Küken ohne maternale Antikörper	100
6.3.	Notwendige Prozessierung der Daten zum Antikörperrepertoire nach erfolgreicher Qualitätskontrolle.....	100
7.	ZUSAMMENFASSUNG	102
8.	SUMMARY	104
9.	LITERATURVERZEICHNIS.....	105
	ANHANG	115
	DANKSAGUNG	119

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 B-Zellen im embryonalen Blut zwischen ET8 – ET18	5
Abb. 2 Schema eines Immunglobulinmoleküls.....	8
Abb. 3 Kodierung der Isotypen der Immunglobuline durch das konstante Segment	9
Abb. 4 Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Gewebe von JH-KO und IgL-KO Tieren	13
Abb. 5 Cross-linking zwischen BCR und maternalen Antikörpern	17
Abb. 6 Geometrische Mittelwerte ¹ der Titer an maternalen Antikörpern gegen bestimmte Pathogene.....	18
Abb. 7 Immunglobulintiter in Küken ohne maternale Antikörper	20
Abb. 8 Embryonale Blutentnahme	24
Abb. 9 Anpaarungsschema der partiellen Knockouts JH ^{-/-} und IgL ^{-/-}	53
Abb. 10 Auftreten verschiedener Genotypen durch Kreuzung der F ₁ -Generation.....	54
Abb. 11 Gelelektrophorese der Genotypisierungs-PCRs verschiedener Tiere	55
Abb. 12 Durchflusszytometrie von PBMCs vergleichend von WT, JH ^{-/-} und JH ^{-/-} IgL ^{-/-} Tieren an Tag 14	56
Abb. 13 Histologie der Bursa an ET18 vergleichend WT, JH ^{-/-} und JH ^{-/-} IgL ^{-/-} Tiere, 2,5fache Vergrößerung	57
Abb. 14 Histologie der Bursa an Tag 7 vergleichend WT, JH ^{-/-} und JH ^{-/-} IgL ^{-/-} , verschiedene Vergrößerungen	59
Abb. 15 Ergebnisse des magnetischen Sorts der B-Zellen aus embryonalen Organen	61
Abb. 16 Fehlen von Antikörpern im Blut der parentalen JH ^{-/-} Tiere	63
Abb. 17 IgY Gehalt im Dotter von JH ^{-/-} und WT Hennen	64
Abb. 18 Beispielhaftes Genotyping von Versuchs- und Kontrollgruppe	65
Abb. 19 Sexing der Versuchstiere, um die Geschlechterverteilung der Kontrollgruppe an die Versuchsgruppe anzupassen	66
Abb. 20 Gewichte der Versuchsgruppe im wöchentlichen Rhythmus	67
Abb. 21 Zunahmen der Versuchstiere	69
Abb. 22 Gating der PBMCs im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse	70
Abb. 23 Analyse der PBMCs an Tag 63 mittels Durchflusszytometrie	71
Abb. 24 Durchflusszytometrische Analyse der PBMCs an Tag 14	71
Abb. 25 IgM Nachweis von Versuchs- und Kontrollgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten	73
Abb. 26 Quantifizierung von IgM im Blutplasma der Versuchstiere	74

Abb. 27 Mittelwerte der IgY Spiegel im Blut	76
Abb. 28 Serumwerte von IgY im Blutplasma	77
Abb. 29 IgA Spiegel im Blutplasma zu verschiedenen Zeitpunkten	78
Abb. 30 Regression des IgA Titer im Blutplasma	79
Abb. 31 IgA Expression der Cäcaltonsille	80
Abb. 32 anti-KLH ELISA aus Blutplasma vor Immunisierung	81
Abb. 33 ELISA auf IgM spezifische anti-KLH Antikörper	82
Abb. 34 Detektion IgY spezifischer anti-KLH Antikörper	83
Abb. 35 Amplifikation der leichten Immunglobulinkette	84
Abb. 36 Schema der isotypspezifischen VDJ-Amplifikation	85
Abb. 37 VDJ-Amplifikation auf isotypspezifischer cDNA	85

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Übersicht der Primer für die isotypspezifische cDNA Synthese	30
Tabelle 2 Auflistung der verwendeten Primer zur Genotypisierung und zum Sexing von Tieren.....	31
Tabelle 3 PCR Bedingungen für Genotypisierungs-PCRs.....	31
Tabelle 4 PCR Bedingungen für das Sexing von Hühnern.....	32
Tabelle 5 Primer zur Amplifikation der variablen Region der Immunglobulinketten .	34
Tabelle 6 Zuordnung der Barcodes zur individuellen Probenkennzeichnung für die Sequenzierung mit Novogene (UK) Company Ltd.....	35
Tabelle 7 PCR Bedingungen für die Amplifikation der variablen Region der leichten Kette	35
Tabelle 8 qRT-PCR Bedingungen zur Amplifikation von IgA.....	41
Tabelle 9 Aufstellung der verwendeten Antikörper	45
Tabelle 10 Verwendete Lebend-Tot-Farbstoffe	45
Tabelle 11 Verwendete Standards zur Quantifizierung von Immunglobulin	46
Tabelle 12 Antikörper für den Nachweis von Immunglobulin im ELISA	47
Tabelle 13 Verwendete Primärantikörper für die Immunhistologie.....	51
Tabelle 14 Anpaarungsschema zur Generierung von Tieren ohne maternale Antikörper.....	62
Tabelle 15 Untersuchungs- und Probennahmerhythmus der Versuchstiere	62
Tabelle 16 Qualitätskontrolle der analysierten NGS-Daten mit FastQC.....	89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AID	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase
Aqua bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCR	B-Zell Rezeptor
bp	Basenpaare
C _{H/L}	Konstantes Gensegment der schweren/leichten Kette
C _{μ/γ/α}	Isotypspezifisches konstantes Gensegment
CCR7	Chemokinrezeptor 7
CD79 _{α/β}	Oberflächenproteine auf B-Zellen, äquivalent zu Ig _{α/β}
CDR	Complementarity-determining-Region
CXCL12	Stromal derived factor – Ligand für CXCR4
CXCR4	Chemokinrezeptor 4
D	Lebenstag
D _H	Diverstitätssegment der schweren Kette
ET	Embryonaltag
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
FR	Framework-Region
FcR	Fc-Rezeptor
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor des Säugers
FcRY	Äquivalent zum FcRn im Huhn
g	Erdbeschleunigung
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
Ig _{α/β}	Transmembranöse Proteine des BCR Komplexes
IgH	schwere Immunglobulinkette
IgL	leichte Immunglobulinkette
IgY/M/A	Isoformen der Immunglobuline im Huhn
IL-7	Interleukin 7
ITAM	Tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv
ITIM	Tyrosin-basiertes hemmendes Motiv
J _{H/L}	J-Segment der schweren/leichten Kette

KLH	Keyhole limpet hemocyanin
KO	Knockout
MACS	Magnetischer Zellsort der Firma Miltenyi
mat.neg.	Tiere ohne maternale Antikörper (Versuchsgruppe)
mat.pos.	Tiere mit maternalen Antikörpern (Kontrollgruppe)
MW	Mittelwert
NGS	Next-Generation-Sequencing
PBL	Peripheral Blood Leukocytes
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGCs	Primordiale Keimzellen
POD	Peroxidase
p.i.	<i>post injectionem</i>
rpm	rounds per minute
RSS	Recombination signal sequeces
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SPF	Spezifisch pathogen frei
TdT	terminale Deoxyribonukleotidyltransferase
V _{H/L}	Variables Gensegment der schweren/leichten Kette
WT	Wildtyp – nicht modifiziertes Tier
+	unveränderter Genlocus
-	genetisch modifizierter Genlocus
+/-	heterozygot verändertes Tier
-/-	homozygoter Träger der genetischen Modifikation

1. EINLEITUNG

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Körper vor äußeren Einflüssen zu schützen. Aus dieser Anforderung heraus entwickelte sich im Lauf der Evolution eines der ausgeklügeltsten und vielfältigsten Systeme des Körpers. Durch das Zusammenspiel verschiedenster Faktoren können körpereigene von körperfremden Strukturen unterschieden und, falls notwendig, eliminiert werden.

Auch wenn das Wissen darüber nicht allgemein präsent ist: Einige der grundlegenden Erkenntnisse der Immunologie wurden durch die Forschung am Huhn gewonnen. So wurden B-Zellen nach der Bursa Fabricii, einem immunologischen Organ der Vögel benannt, und auch das allgemeine Prinzip der Impfung wurde bei der Forschung an Hühnern entdeckt. Darüber hinaus war das Hühnergenom 2004 das erste sequenzierte Genom einer Nutztierspezies. Allerdings ist das Hühnergenom enorm Guanin- und Cytosin-reich, was die Entschlüsselung der einzelnen Gene sehr schwierig macht. Allein dadurch bietet das Huhn viele Forschungsansätze. Andererseits ist die Forschung am Huhn auch essenziell, da zum Beispiel Influenzaviren in Vögeln eine sehr hohe Mutationsrate haben und damit Virusvarianten entstehen können, die für den Menschen gefährlich sein könnten.

Neben dem wissenschaftlichen Interesse steigt seit Jahrzehnten der Bedarf an Lebensmitteln, die vom Huhn stammen. Mit den modernen Haltungsformen geht ein hoher Infektionsdruck einher. Um dabei Krankheitsausbrüche zu verhindern, ist die Impfung eine unerlässliche Methode. Dabei wird das Immunsystem des Huhnes mit den Erregern kontrolliert in Kontakt gebracht und schützt so das Tier vor der Erkrankung. Ein ähnlicher Mechanismus, der sich im Laufe der Evolution entwickelt hat, ist die Übertragung von Antikörpern, die von der Mutter stammen (= maternal). Durch diese übertragenen Immunglobuline gibt die Henne ihren Küken einen Schutz vor Krankheitserregern mit, den diese in den ersten Lebenswochen noch nicht selbstständig ausbilden können und der einige Zeit vorhält.

In dieser Arbeit wird die Bedeutung der maternalen Antikörper auf die Entwicklung des Kükens untersucht. Dabei zeigt sich, dass die maternalen Antikörper beispielsweise auch Einfluss auf das Gewicht des Jungtieres haben – was durchaus

wirtschaftliche Folgen hätte.

Für die Generierung von Küken ohne maternale Antikörper wurden genetisch modifizierte Hühner (JH-KO) verwendet. Homozygote Tiere mit dieser Modifikation ($JH^{-/-}$) haben keine funktionalen Antikörper, da die B-Zell Entwicklung, auf deren Grundlage die Antikörper (= Immunglobuline) entstehen, in $JH^{-/-}$ Tieren beeinträchtigt ist.

Diese genetisch modifizierten Tiere mit einem Knockout der schweren Immunglobulinkette (JH-KO) wurden darüber hinaus mit Tieren mit einem Knockout der leichten Immunglobulinkette (IgL-KO) kombiniert, um zu untersuchen, inwiefern der Mechanismus des Gen-Rearrangements im Rahmen der Bildung der Immunglobuline die B-Zell Entwicklung im Hühnerembryo beeinflusst.

2. LITERATURÜBERSICHT

Das Immunsystem bezeichnet die Gesamtheit der körpereigenen Abwehrsysteme zur Elimination von körperfremden Strukturen. Bei Hühnern und allen Vertebraten lässt sich die Immunabwehr in die angeborene und die erworbene Immunantwort teilen [6]. Beide Teile enthalten sowohl zelluläre als auch lösliche Komponenten, die im Zusammenspiel den Organismus vor Infektionen und anderen schädlichen Einflüssen schützen. Während das angeborene Immunsystem durch eine schnelle, aber unspezifische Immunantwort die erste Verteidigungslinie darstellt, ist das adaptive Immunsystem sehr spezifisch angelegt und langsamer im Vergleich zum angeborenen Immunsystem [6]. Die Erkennung der Antigene, also körperfremder Strukturen, erfolgt dabei über einen membranständigen B-Zell Rezeptor Komplex (BCR) und durch lösliche Antikörper. Ein membrangebundenes Immunglobulin (sIg) ist dabei ein Teil des BCR. Die lösliche Form dieser Immunglobuline sind Antikörper [7]. Ein Immunglobulin ist hoch spezifisch für das Antigen, das es bindet im Sinne des Schlüssel-Schloss Prinzips [7]. In der Gattung der *Aves* (Vögel) begegnen sich B-Zelle und Antigen hauptsächlich in den peripheren lymphoiden Geweben. Nach der Interaktion mit T-Helferzellen kann sich diese B-Zelle zur Plasmazelle differenzieren und das spezifische Immunglobulin in Form von löslichen Antikörpern sezernieren [6].

Die Entwicklung der B-Zellen und Immunglobuline weist im Huhn einige grundlegende Unterschiede im Vergleich zum Säuger auf. Das wohl prominenteste Merkmal ist dabei die Bursa Fabricii, ein sackähnliches Organ, in dem die wichtigsten Prozesse der B-Zell Entwicklung stattfinden [8].

2.1. Grundlagen der B-Zell Entwicklung im Huhn

B-Zellen tragen mit dem membrangebundenen Antikörper essenziell zur Erkennung körperfremder Strukturen bei [6]. Die Entwicklung der B-Zellen lässt sich im Haushuhn in eine präbursale, eine bursale und eine postbursale Phase gliedern [8]. Im adulten Tier zirkulieren die B-Zellen im Blut sowie in den lymphoiden Geweben [9]. Wenn sie dort an ein Antigen binden, kommt es zur Bildung von germinalen Zentren, wo die Affinitätsreifung und die Serokonversion erfolgt [10].

2.1.1. Präbursale Schritte der B-Zell Entwicklung

In der präbursalen Phase definieren sich hämatopoetische Vorläuferzellen der B-Zell Linie zugehörig. Ab ET5 (ET = Embryonaltag) finden sich im Hühnerembryo pluripotente hämatopoetischen Stammzellen, welche den paraaortischen Foci entstammen. Sie besiedeln die Blutinseln von Dottersack, Leber, Knochenmark und Milz [11]. Dort durchlaufen die Zellen das sogenannte Gen-Rearrangement. Dieser Prozess ist die Grundlage für die Bildung des membranständigen Immunglobulins und durch dieses Merkmal können die Zellen als präbursale B-Zellen angesprochen werden. Beim Gen-Rearrangement fügen sich ein Variables (V), ein Joining (J) und im Falle der schweren Kette noch ein Diversitäts (D) Segment mit einem Konstanten (C) Segment zusammen (siehe auch Abb. 2) [6]. Auf den Mechanismus des Gen-Rearrangements wird in 2.2.2 detailliert eingegangen. Beginnend mit ET10 wandern sämtliche hämatopoetischen Vorläuferzellen in Thymus, Milz, Bursa und Knochenmark aus [12]. Die durch das Gen-Rearrangement der leichten und schweren Immunglobulinkette charakterisierten präbursalen Zellen wandern dabei hauptsächlich in die Bursa ein (siehe 2.1.2) [13, 14]. Ab ungefähr ET10-15 ist es auch möglich, das rearrangierte Oberflächenimmunglobulin der B-Zellen im Blut zu detektieren [15].

Ein Merkmal, um möglichst früh präbursale B-Zellen identifizieren zu können, ist das Oberflächenantigen chB6, auch bekannt als Bu1 Antigen [16]. Die Funktion dieses Antigens ist bisher unbekannt – es wird aber stabil über die embryonale Phase und darüber hinaus auf den B-Zellen exprimiert [3].

2.1.2. Die Bursa als zentrales Organ der B-Zell Entwicklung

Die Bursa ist das zentrale Organ der B-Zell Entwicklung. Die wichtigsten Prozesse, die in der Bursa stattfinden, sind die Expansion der B-Zellen und der Mechanismus der Genkonversion, der unter 2.2.2 detailliert beschrieben ist. Dabei werden Sequenzen des rearrangierten Gens durch Teile von Pseudogenen ersetzt.

Bereits an ET5 beginnt sich die Anlage der Bursa aus dem Epithel der proctodealen Region der Kloake zu entwickeln [17]. Die Bursa behält dabei immer einen dünnen Verbindungsgang zur Kloake. Der Aufbau der Bursa besteht aus 12 – 20 longitudinalen Falten (Plicae), die mit insgesamt ca. 12.000 Follikeln dicht besetzt sind [18]. Die präbursalen B-Zellen wandern kontinuierlich zwischen ET10 -15 aus dem Blut in die Bursa ein mit einem Maximum an ET12 (siehe Abb. 1) [3, 19].

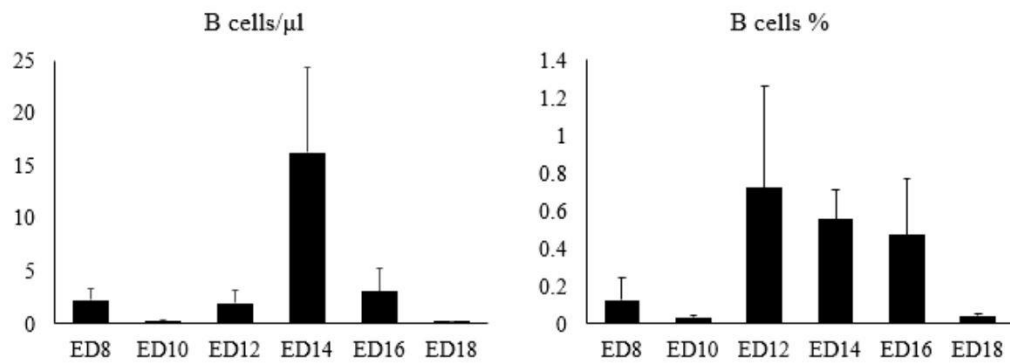


Abb. 1 B-Zellen im embryonalen Blut zwischen ET8 – ET18

Isolierte PBMCs wurden auf die Expression von Bu1 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das linke Diagramm zeigt die absoluten Zahlen, das rechte die relativen Zahlen. Modifiziert nach Lapidou M. 2017 [3]

Bis heute ist noch nicht vollständig erforscht, welche Faktoren den Mechanismus der Einwanderung der B-Zellen in die Bursa regulieren. Es wurde vielfach vermutet, dass die grundsätzliche Voraussetzung der Migration der präbursalen Zellen in die Bursa die Expression eines funktionalen sIgs ist [20-22]. Schusser et al. zeigten, dass trotz Entfernung von schwerer oder leichter Immunglobulinkette die Zellen weiterhin in die Bursa wandern (siehe auch 2.2.3) [1, 2]. Aber auch Chemokine, Selektine oder Adhäsionsfaktoren könnten eine Rolle spielen [23]. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass die B-Zellen während der Zeit der Migration CXCR4 exprimieren. Dieses Chemokin aus der C X C- Familie bindet an CXCL12, auch bekannt als Stromal derived factor-1. CXCL12 wird im Stroma der Bursa exprimiert und CXCR4 exprimierende Zellen zeigen eine gerichtete Wanderung zu CXCL12 [24]. Möglich wäre auch, dass das Sialyl-Lewis X Epitop zur Einwanderung in die Bursa beiträgt [25]. Dieses Epitop wird auf präbursalen Zellen exprimiert und kann an Selektine binden [26]. Selektine vermitteln die Adhäsion der Leukozyten an der Endothelwand und könnten dadurch zur Einwanderung der präbursalen Zellen in die Bursa beitragen [27]. Während der Genkonversion wandelt sich dieses Sialyl-Lewis X Epitop zu Lewis X. Vor der Auswanderung aus der Bursa verlieren aber immer mehr Zellen dieses Epitop und werden von Lewis X^{high} zu Lewis X^{low} exprimierenden Zellen [27]. Dieses Epitop könnte also eine dauerhafte Rolle während der B-Zell Entwicklung spielen.

Bei der Einwanderung der Zellen in die Bursa besiedeln 2 - 5 präbursale Zellen einen Follikel [18, , 28]. Auch hier ist bisher nicht bekannt, auf welches Signal oder

durch welches Merkmal die Zellen proliferieren. Dass die Erkennung einer bestimmten Struktur durch das sIg nicht ausschlaggebend für die Proliferation der Zellen ist, zeigen Versuche mit einem gekürzten μ . Dabei wurde durch einen retroviralen Vektor die V_H und das $C\mu 1$ Segment des sIgs überexprimiert und dennoch proliferieren die B-Zellen [29, 30]. Auch die alleinige Expression eines sIg kann wiederum nicht ausschlaggebend für die Expansion der Zellen sein, da auch bei unvollständigem sIg eine Expansion erfolgt [1].

Aus der B-Zell Entwicklung der Maus weiß man, dass die Assoziierung des B-Zell Rezeptor Komplexes eine Voraussetzung für die Proliferation ist [31]. Bei der Assoziierung des BCR Komplexes lagern sich transmembranöse Moleküle an das rearrangierte sIg an. Diese Moleküle werden als $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ bzw. $CD79\alpha$ und $CD79\beta$ bezeichnet und sind in der aktiven B-Zelle durch Tyrosin-basierte aktivierende Motive (ITAM) an der Signaltransduktion nach der Antigenbindung beteiligt. Durch Versuche von Ratcliffe et al. sowie durch Homologien zwischen Mensch, Maus und Huhn, wird vermutet, dass die Assoziierung des BCR im Huhn für die weitere Proliferation nötig ist [21, 32]. Allerdings waren bisherige Versuche, Hühner $CD79\alpha$ zu detektieren, nicht erfolgreich (Unveröffentlichte Daten).

Um den Zeitpunkt des Schlupfes beginnen sich die Follikel in einen Rinden- und einen Markbereich zu separieren. Der bisherige Follikel wird zum Markbereich und B-Zellen, die über die Basement-Membran auswandern, bilden den Rindenbereich. Die B-Zellen im Rindenbereich proliferieren stark im Gegensatz zu den B-Zellen, die im Markbereich verblieben sind [33]. Die Separierung von Rinde und Mark ist ein Prozess, der ca. vier Wochen nach dem Schlupf beendet ist [17, 21]. Ab diesem Zeitpunkt befindet sich die Bursa in einer Plateauphase und bleibt als primäres lymphatisches Organ bis zur Geschlechtsreife mit 4 - 6 Monaten bestehen. Die anschließende Involution der Bursa hängt mit dem Anstieg des Testosteronspiegels zusammen [34].

2.1.3. Postbursale Phase der B-Zellen und Affinitätsreifung

Ab dem Zeitpunkt des Schlupfes beginnen B-Zellen aus der Bursa auszuwandern [35]. Es emigrieren allerdings nur 5% der gebildeten Zellen aus der Bursa, die restlichen Zellen gehen durch Apoptose zugrunde [36]. Welches Signal ausschlaggebend für die Apoptose ist, ist bisher nicht bekannt. Die Expression eines sIgs ist allerdings die Voraussetzung für eine mögliche Emigration [1, 37]. Die

meisten auswandernden B-Zellen stammen aus dem Rindenbereich der Follikel und überleben nur kurz im Blut [33]. Die emigrierten Zellen sind anschließend vor allem in der Milz und den assoziierten lymphatischen Geweben zu finden [38].

Bindet eine B-Zelle an ein Antigen, wurde vom Körper eine zu eliminierende Struktur erkannt. Das primäre Ziel ist nun die Entfernung dieses Pathogens aus dem Organismus mit Hilfe des angeborenen und erworbenen Immunsystems [6]. Während das angeborene Immunsystem nach der Opsonierung den Erreger phagozytiert, findet im Rahmen der erworbenen Immunantwort die Affinitätsreifung statt [6]. Dabei wandern B-Zellen, die dieses Antigen mit ihrem sIg binden können, in lymphatische Gewebe wie z.B. die Milz ein und bilden dort germinale Zentren [6]. In diesen germinalen Zentren wird durch Genkonversion und somatische Hypermutation das Paratop dieser B-Zellen spezifiziert, sodass hoch spezifische Antikörper zur effektiveren Elimination sezerniert werden können [6]. In der frühen Phase der germinalen Zentrumsreaktion überwiegt im Huhn die Genkonversion, wohingegen in der späten Phase überwiegend die somatische Hypermutation stattfindet [39, 40]. Bei der Genkonversion werden Teile der variablen Region durch sogenannte Pseudogene ausgetauscht (siehe 2.2.2). Die somatische Hypermutation wird von der aktivierungsinduzierten Cytidin-Deaminase (AID) ausgelöst. Die AID verursacht Einzelstrangbrüche, deren Reparatur zumeist Punktmutationen zur Folge haben [41]. Arakawa et al. zeigen, dass die AID aber auch während der Entstehung des Antikörperrepertoires für den Prozess der Genkonversion zwingend erforderlich ist [42].

Ab dem initialen Antigenkontakt dauert der Prozess der Affinitätsreifung ungefähr sieben Tage [43, 44]. Neben der Sekretion der dabei entstandenen hochspezifischen Antikörper entstehen auch langlebige Gedächtniszellen, die beim erneuten Antigenkontakt schnell in der Lage sind, diese Antikörper zu sezernieren, und so eine erneute Manifestation des Erregers zu verhindern [7]. Im Huhn gibt es bisher keine Studien zur Charakterisierung dieser Gedächtniszellen.

2.2. Antikörper als Teil der erworbenen Immunantwort

2.2.1. Aufbau und Einteilung von Immunglobulinen

Ein Antikörper (=Immunglobulin) besteht – sowohl als membranständiges sIg als auch in der löslichen Form – aus zwei schweren (IgH – „heavy chain“) und zwei leichten (IgL – „light chain“) Ketten. Alle 4 Ketten haben eine konstante und eine variable Region (Abb. 2). Jede dieser Regionen unterteilt sich in Segmente, welche wiederum einzeln im Genom codiert sind. Die variable Region besteht dabei aus einem Variablen (V) und einem „Joining“ (J) Segment sowie zusätzlich aus einem „Diversity“ (D) Segment im Falle der schweren Kette. Die konstante Region der schweren Kette besteht in der Keimbahnkonfiguration aus vier konstanten (C) Segmenten. Die variable Region der schweren Kette besteht aus einem V_H , einem J_H und einem D_H Segment. Für die leichte Kette sind ein konstantes sowie ein V_L - und ein J_L -Segment codiert.

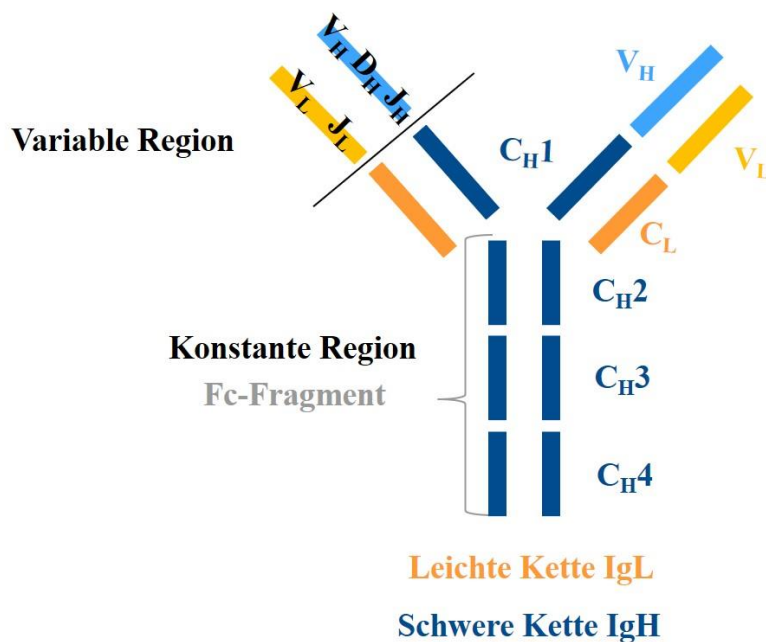


Abb. 2 Schema eines Immunglobulinmoleküls

Der Aufbau eines Immunglobulins besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die wiederum aus je einer konstanten und einer variablen Region bestehen. Die variable Region hat dabei ein V – „Variables“ und ein J – „Joining“ Segment für die leichte Kette, sowie zusätzlich ein D – „Diversity“ Segment für die schweren Kette.

Modifiziert nach Janeway's Immunobiology 8th Edition

Das Fc-Fragment besteht dabei aus Teilen der konstanten Regionen der beiden schweren Ketten. Wenn der Antikörper ein Antigen gebunden hat, erfährt das Fc-

Fragment eine Konformationsänderung, wodurch die Opsonierung für weitere Zellen des Immunsystems sowie die Aktivierung der Komplementkaskade möglich wird [7].

Durch die Wahl eines konstanten Segments der schweren Kette wird der Isotyp des Antikörpers festgelegt (Abb. 3). Die verschiedenen konstanten Segmente befinden sich im Genom 3' von den J_H Segmenten und sind mit den griechischen Buchstaben μ , δ , γ , ϵ , α benannt. Im Genom von Mensch und Maus sind somit IgM, IgD, IgG, IgE und IgA codiert. Weiterhin treten Subklassen wie z.B. IgG2 α und IgG2 β auf [6].

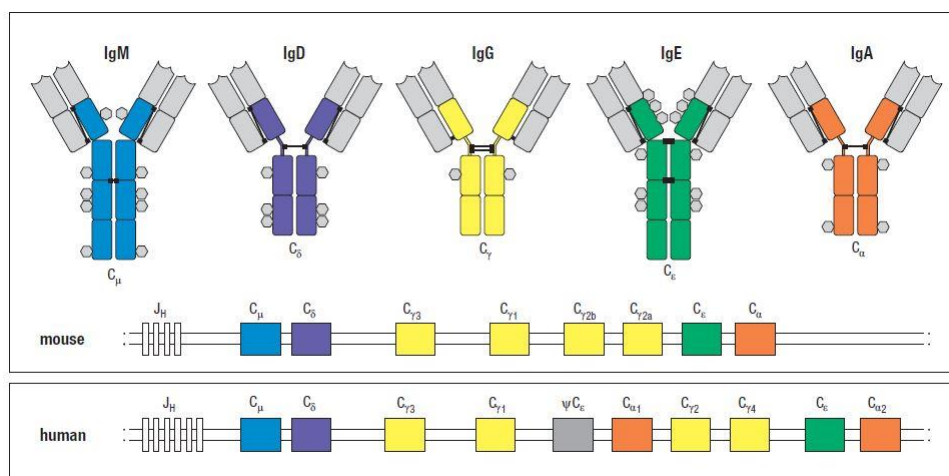


Abb. 3 Kodierung der Isotypen der Immunglobuline durch das konstante Segment

3' des J_H Segments befinden sich die Segmente für die konstante Region. Je nach Wahl des Segments wird der Isotyp des Antikörpers bestimmt. In Mensch und Maus sind darüber hinaus für IgG Subklassen wie IgG2 α und IgG2 β bekannt.

Modifiziert nach Janeway's Immunobiology 8th Edition

Im Huhn dagegen kommen nur die Isotypen IgM und IgA sowie IgY vor, die codiert sind durch C μ , C γ und dazwischen in umgekehrter Orientierung C α [45, 46]. IgY ist dabei dem Säuger IgG in Form und Funktion sehr ähnlich [47]. Die schwere Kette des IgY ist länger als beim IgG des Säugers und das Hühner IgY enthält keine Hinge-Region (Cystein-Disulfidbrücken am oberen Ende des Fc-Fragments). Dadurch hat das Hühner IgY eine höhere Molekülmasse und ist weniger flexibel [47-49]. IgD und IgE Isotypen sind im Huhn nicht bekannt, aber durch die Ähnlichkeiten von IgE mit IgY in Struktur und Verteilung der Glykosylierungen wird angenommen, dass es ein gemeinsames Vorläufermolekül gegeben haben kann [21, 50]. IgD wurde 1982 im Huhn beschrieben [51] und erst

kürzlich auch im Strauß [52]. Zwischenzeitlich galt es als sicher, dass es kein IgD Homolog im Vogel gibt.

Durch die verschiedenen Isotypen sind spezielle Funktionen bedingt. So bilden IgM Antikörper als membrangebundenes Monomer einen Teil des B-Zell Rezeptor Komplexes, treten allerdings in löslicher Form fast ausschließlich als Pentamer auf [6]. IgM Antikörper sind die ersten Immunglobuline, die nach der B-Zell Aktivierung gebildet werden, da das C μ Gensegment direkt nach den Segmenten der variablen Region codiert ist [6]. Erst im weiteren Verlauf der Immunantwort kommt es zu einem Immunglobulinklassenwechsel, sodass auch andere konstante Segmente per alternativem Splicing angehängt und so weitere Isotypen synthetisiert werden [53]. IgA tritt im Huhn analog zum Mensch vorrangig als Dimer auf und wird im Darm mit einer sekretorischen Komponente gekoppelt [48, 54]. Als physiologische Serumkonzentration werden für IgM Antikörper 1,3 mg/ml, für IgG bzw. IgY Antikörper 5,0 – 6,0 mg/ml und für IgA im Serum 0,3 – 0,6 mg/ml angegeben [21, 55].

2.2.2. Entstehung und Vielfalt des Antikörperrepertoires

Die Erkennung von Antigenen durch Antikörper funktioniert nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Dabei wird von einem spezifischen Antikörper eine bestimmte Struktur (Epitop) eines Antigens erkannt [7]. Um möglichst viele Epitope erkennen zu können, ist es nötig, ein möglichst großes Antikörperrepertoire zu bilden. Die variable Region des Antikörpers besteht dabei aus den vier variablen Regionen aller vier Immunglobulinketten. Die durch die Gesamtheit dieser vier Segmente gebildete Struktur nennt man Paratop [7]. Der erste Mechanismus für die Bildung der Immunglobuline ist das Gen-Rearrangement. Dabei werden aus dem Genom ein V- (Variables), ein D- (Diversitäts – nur im Fall der schweren Kette) mit einem J- (Joining) Segment zusammengeführt [6]. Diese drei Segmente bilden die variable Region des Immunglobulins. Erst während des RNA-Splicings wird noch ein C- (konstantes) Segment hinzugefügt [6].

Im Huhn gibt es einen Genlocus für die schwere Kette und einen Genlocus für die leichte Kette. Vom Menschen und der Maus sind für die leichte Kette zwei Genloki, der κ - und der λ -leichte Kette Genlocus bekannt [6], im Huhn ist nur der λ - Genlocus beschrieben [56]. Außerdem finden im Huhn das Rearrangement von leichter und schwerer Kette zum selben Zeitpunkt statt [15], wohingegen im Menschen

zuerst das VDJ-Rearrangement der schweren Kette stattfindet, das dann mit einer surrogate light chain auf der Zelloberfläche das Rearrangement der leichten Kette auslöst [7].

Während im Genom von Mensch und Maus zahlreiche Gensegmente bekannt sind, welche beim Gen-Rearrangement zufällig kombiniert werden und dadurch eine große Vielfalt kreieren, ist bei Vögeln jeweils nur ein Gensegment für V_H , J_H und V_L und J_L bekannt [57-59]. Lediglich für D_H gibt es 16 verschiedene Segmente, die aber auf Proteinebene oftmals die gleiche Aminosäurenabfolge haben [60, 61]. Erste D_H zu J_H sowie anschließend V_H zu DJ_H Verknüpfungen finden ab ET5-6 im Dottersack und zwei bis drei Tage später in der Milz statt [29]. Während des Gen-Rearrangements der schweren Kette treten häufig D_H zu DJ_H Rearrangements auf. Da diese DDJ_H Sequenzen aber nicht im geschlüpften Tier zu finden sind, ist ihre biologische Bedeutung unklar [60, 61]. Beim Gen-Rearrangement der leichten Kette wird das V_L mit dem J_L Segment verknüpft. Wenn zwei Segmente miteinander verknüpft werden, wird die DNA zwischen diesen beiden Segmenten durch den in RAG-1 und RAG-2 codierten Rekombinase Komplex anhand der Recombination signal sequences (RSS) entfernt [7]. Bei diesem Schritt können zufällige pallindromartige Nukleotide eingefügt werden oder einzelne Nukleotide durch Exonukleasen entfernt werden [7]. Das Einsetzen zufälliger Nukleotide durch die terminale Deoxyribonukleotidyl-Transferase (TdT) ist im Huhn nicht möglich [60-62]. Beim Gen-Rearrangement werden also codierende Segmente zufällig miteinander verknüpft und die Schnittstelle wird modifiziert. Da aber das Einsetzen zufälliger Nukleotide im Huhn nicht möglich ist, ist die so entstandene Diversität (= junctional diversity) wesentlich geringer als im Säuger [45]. Die Folge dieser Diversifizierung ist, dass 2 von 3 dieser Verknüpfungen „out of frame“ sind, das heißt diese DNA-Sequenz kann nicht in ein Protein transkribiert werden [27]. Dies ist auch für die leichte Kette der Fall, obwohl es für die leichte Kette nur je ein V_L und J_L Segment gibt [14]. Zusammenfassend gibt es beim Huhn durch Gen-Rearrangement mit Diversifizierung ca. 1500 Kombinationsmöglichkeiten für die leichte und die schwere Kette und nach der Genkonversion sind es ca. 3×10^9 Varianten [45]. Beim Mensch wird durch die größere Anzahl an Segmenten und durch das Einsetzen der Nukleotide durch die TdT ein Repertoire von ca. 10^{12} verschiedenen Immunglobulinen gebildet [63].

Um das Repertoire des Huhns zu vergrößern, ist der Mechanismus der

Genkonversion von zentraler Bedeutung. Dabei werden unterschiedlich lange Stücke von Pseudogenen in die variable Region von leichter und schwerer Kette eingesetzt [45]. Diese Pseudogene liegen 5' des funktionalen V-Segments und können für das Rearrangement nicht verwendet werden, da ihnen sowohl das Leader-Exon als auch eine Promotor-Region und die RSS Sequenzen fehlen [27, 57]. Im Huhn sind bisher ca. 60 Pseudogene für die schwere Kette und 25 Pseudogene für die leichte Kette beschrieben [58, 61]. Eine Substitution mit Teilen eines Pseudogens kann zwischen einer und 300 Basen betragen [21]. Da der Lokus der schweren Kette aber bisher noch nicht beschrieben ist, lässt sich dies nicht genau beziffern. Der Prozess der Genkonversion tritt während der klonalen Expansionsphase alle 10 - 15 Zellzyklen auf und so kann eine B-Zelle bis zu zehn Runden der Genkonversion durchlaufen [57, 64]. Dabei bedingen die Prozesse der Genkonversion zu 98% keine Verschiebung des Leserahmens [65].

Ein weiterer – bereits erwähnter – Mechanismus zur Vergrößerung des Repertoires tritt im Rahmen der Affinitätsreifung der Antikörper auf. Die aktivierungsinduzierte Deaminase (AID) verursacht dabei Einzelstrangbrüche, die zumeist Punktmutationen – die sogenannte somatische Hypermutation – zur Folge haben (siehe 2.1.3) [6].

Der Mechanismus der Genkonversion ist nicht nur bei Vögeln für die Generierung des Antikörperrepertoires ausschlaggebend. Auch in Kaninchen, Rindern, Schafen und Schweinen ist das Repertoire nach dem Immunglobulin-Rearrangement sehr begrenzt und wird erst durch die Genkonversion im darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT) diversifizieren [66-69].

2.2.3. *In vivo* Knockout von schwerer und leichter Immunglobulinkette

Die Generierung genetisch modifizierter Hühner bietet in der immunologischen Forschung vielfältige Möglichkeiten und soll unter anderem dazu dienen, die Pathogenese von Erregern zu erforschen und auf lange Sicht die Infektion mit selbigen zu verhindern. Während die ersten genetisch modifizierten Mäuse schon 1981 beschrieben wurden, war im Huhn lange nicht bekannt, wie man genetisch modifizierte Tiere generieren kann [70, 71]. Erst durch die Möglichkeit, primordiale Keimzellen (PGCs) zu isolieren, zu kultivieren, zu modifizieren und zu reimplantieren, konnten genetisch modifizierte Linien generiert werden [72]. PGCs sind dabei wie im Säuger Vorläuferzellen der Gameten, die nach ca. 50 – 55 h

Inkubation aus dem Blut in die Gonaden auswandern und sich dort zu Eizellen und Spermien differenzieren [73, 74]. Durch Modifikation der PGCs entfernten Schusser et al. das J-Segment der schweren Immunglobulinkette mittels homologer Rekombination [1]. Die Charakterisierung der so generierten JH-KO Tiere zeigte, dass homozygote JH-KO Tiere ($JH^{-/-}$) eine Depletion der peripheren B-Zellen haben (siehe Abb. 4A-PBLs). Die histologische Analyse zeigt, dass die B-Zellen weiterhin in der Lage sind, die Bursa zu besiedeln und dort zu proliferieren [1]. Abb. 4A-Bursa zeigt, dass die $JH^{-/-}$ Tieren signifikant weniger Bu1-positive Zellen in der Bursa haben als WT Tiere. Darüber hinaus sind die B-Zellen in $JH^{-/-}$ Tieren nicht in der Lage, aus der Bursa auszuwandern, und auch eine Separation der Follikel in Mark- und Rindenbereich fehlt. Durch das Fehlen von peripheren B-Zellen und damit das Fehlen von funktionalen Antikörpern zeigen diese Tiere keine gerichtete Immunantwort auf die Stimulation mit einem Antigen. Das Rearrangement und die Genkonversion der leichten Kette ist in $JH^{-/-}$ Tieren nachweisbar, was darauf schließen lässt, dass dieser Prozess unabhängig von der Expression des sIgs stattfindet [1].

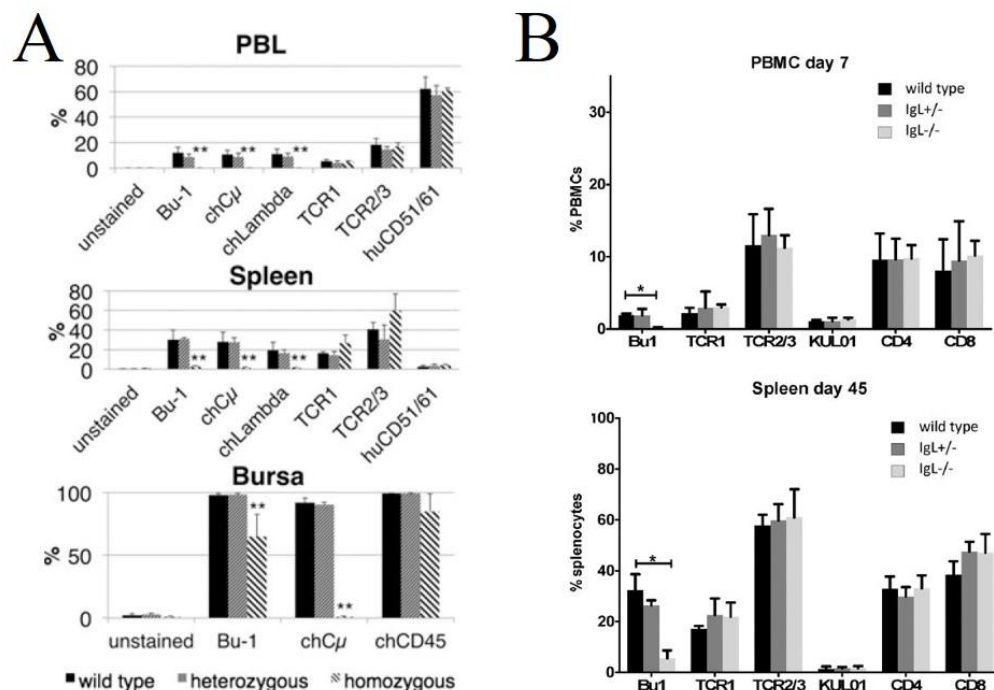


Abb. 4 Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Gewebe von JH-KO und IgL-KO Tieren

A – Analyse der JH-KO Tiere auf verschiedene Oberflächenantigene in PBLs und Milz im Alter von 5 Wochen und der Bursa im Alter von 3 Tagen. Modifiziert nach Schusser et al. 2013 [1]; B – Analyse von PBMCs an Tag 7 und Milz an Tag 45 von IgL-KO Tieren. Modifiziert nach Schusser et al. 2016 [2]

Bei Hühnern, die ein Knockout der leichten Kette der Immunglobuline haben (IgL-KO) kommt es zur Expression von Immunglobulinen, die nur aus der schweren Kette bestehen [2]. Zusätzlich zur leichten Kette fehlt diesen Antikörpern aber noch die C_{H1} Domäne, wie es auch z.B. bei Kameliden der Fall ist, die physiologischerweise Schwere-Ketten-Antikörper haben [75]. Durchflusszytometrische Analysen zeigen, dass homozygote IgL-KO Tiere (IgL^{-/-}) einen geringen Prozentsatz an Bu1-positiven peripheren B-Zellen haben und auch in der Milz Bu1 positive Zellen detektierbar sind (Abb. 4B). Es wurde gezeigt, dass diese peripheren B-Zellen ursprünglich aus der Bursa stammen. Die Histologie von Bursen der IgL^{-/-} Tiere zeigte, dass auch hier B-Zellen in die Bursa einwandern und dort proliferieren. Im Gegensatz zu JH^{-/-} Tieren kommt es bei IgL^{-/-} Tieren aber weiterhin in manchen Follikeln zur Separation der Follikel in einen Rinden- und einen Markbereich. Immunisiert man IgL^{-/-} Tiere mit KLH (Keyhole limpet hemocyanin), waren geringe Titer an anti-KLH spezifischen Antikörpern des Isotyps IgM und IgY im Blutplasma detektierbar [2].

Die Migration der B-Zellen in die Bursa und die Proliferation derselbigen erfolgt also unabhängig von der Expression der schweren oder der leichten Kette.

2.3. Maternale Antikörper

Maternale Antikörper werden von der Mutter auf den Nachwuchs übertragen, da das Immunsystem zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht ausgereift ist [6]. Das angeborene Immunsystem ist zwar bei Geburt voll funktionstüchtig, aber das erworbene Immunsystem entwickelt sich erst während der ersten Lebenswochen [6]. Wie unter 2.1.3 beschrieben, beginnen B-Zellen im Huhn erst um den Schlupf herum aus der Bursa auszuwandern und auch das T-Zell System ist noch in der Entwicklung [10]. Maternale Antikörper schützen das Jungtier in dieser Zeit vor Infektionen [6]. Bei speziellen Pathogenen hält dieser Schutz bis zu einem Alter von sechs Monaten [76, 77]. Maternale Antikörper werden bei den meisten Tierspezies mit der Aufnahme des Kolostrums übertragen und der Großteil davon sind IgG Antikörper [78, 79].

Natürliche Antikörper dagegen sind Antigen-bindende Antikörper, die im Blut von Tieren zu finden sind, obwohl diese nicht mit dem fraglichen Antigen immunisiert

worden sind. Sie haben meistens eine breite Spezifität sowie eine geringe Affinität und sind zumeist vom Isotyp IgM [80, 81]. Sie scheinen im Säuger zusammen mit dem Komplementsystem eine grundlegende Immunabwehr zu bilden [82] und es wird vermutet, dass die natürlichen Antikörper dazu beitragen, eine Reaktion des Körpers auf eigene Antigene wie z.B. Myoglobin, Ferritin oder Albumin zu verhindern [83]. Die Bedeutung der natürlichen Antikörper in der Regulation der Immunantwort im Jungtier muss allerdings noch weiter erforscht werden.

2.3.1. Übertragung und Aufnahme der maternalen Antikörper

Die Übertragung der maternalen Antikörper erfolgt entweder transplazentär während der Trächtigkeit oder in den ersten 24 h nach der Geburt über das Kolostrum [4]. Welche Übertragungsart überwiegend erfolgt, hängt von der Spezies und der Art der Plazenta ab. Als Grundsatz gilt: Je mehr Gewebeschichten zwischen maternalem und fetalem Blut sind, desto mehr erfolgt die Übertragung der maternalen Antikörper über das Kolostrum [4]. Menschen haben eine hämochoriale Plazenta, bei der die fetalen Trophoblasten eng mit der mütterlichen Basalplatte verwachsen sind [79]. Dementsprechend erfolgt die Übertragung der maternalen Antikörper hauptsächlich transplazentär über Pinozytose [84]. Bei der Pinozytose werden gelöste Antikörper in Vesikeln aufgenommen und in den fetalen Blutkreislauf transportiert [79]. Hunde und Katzen haben eine endotheliochoriale Plazenta, die aus mehreren Gewebeschichten besteht [79]. Dadurch erfolgt die Übertragung zum geringen Teil über die Plazenta, aber zum größeren Teil über das Kolostrum [85-87]. Bei den Nutztieren mit einer epitheliochorialen Plazenta erfolgt die Übertragung ausschließlich über das Kolostrum [88, 89]. Da Vögel ovipar sind, erfolgt die Übertragung über den Dotter und die Amnionsflüssigkeit [90, 91].

Um die Aufnahme der maternalen Antikörper über das Kolostrum zu ermöglichen, ist die Darmbarriere der Jungtiere in den ersten 24 h nach der Geburt für Makromoleküle durchlässig [78, 92, 93]. Die IgG Moleküle binden mit ihrem Fc-Fragment an den FcRn-Rezeptor (neonataler Fc-Rezeptor) im niedrigen pH Bereich des Darmlumens. Danach werden sie effizient und direkt auf die basolaterale Seite transportiert und bei physiologischem pH ins Blut sezerniert. [78]. Der Großteil der maternalen Antikörper ist vom Isotyp IgG, da der FcRn Rezeptor IgG spezifisch ist [4]. Das Äquivalent dieses Rezeptors im Vogel ist der FcRY-Rezeptor [94]. Dieser ist unter 2.3.3 genauer beschrieben.

2.3.2. Interferenzen von Vakzinen mit maternalen Antikörpern

Die Vorteile der maternalen Antikörper nutzt man gezielt im Rahmen von Mutterschutzimpfungen. So werden beispielsweise tragende Kühe gegen Rota-/Coronaviren geimpft, um das Kalb vor der klinischen Manifestation dieser Viren zu schützen [95]. Auch im Geflügelbereich wird dieses Prinzip zur Verhinderung der aviären Enzephalomyelitis oder des aviären Leukosevirus B verwendet [96, 97]. So bewirkt man im Allgemeinen einen Schutz des Jungtieres von bis zu drei bis sechs Wochen [76, 98]. Allerdings sinkt der Spiegel der maternalen Antikörper in den ersten Lebenswochen kontinuierlich und die Jungtiere werden geimpft, um auch weiterhin gegen Infektionen geschützt zu sein. Eine Interferenz der maternalen Antikörper mit den Vakzinen ist beispielsweise bei aviärer Influenza oder bei der Infektiösen Bursitis (IBDV) beschrieben [99, 100]. Durch die Interferenz der beiden Agenzien kommt es zum reduzierten Impferfolg. Die Impfung muss folglich wiederholt werden, um den gewünschten Schutz zu gewährleisten.

Die Mechanismen dieser Interferenz sind vielschichtig. Beispielsweise gibt es die Theorie des „Epitope Maskings“. Dabei binden die maternalen Antikörper an das Impfagens und dadurch kann das Antigen nicht mehr von den B-Zellen des Jungtiers erkannt werden [4]. Dabei müssen nicht alle Epitope des Antigens bedeckt sein, sondern schon die Anlagerung weniger maternaler Antikörper reicht aus, um das Antigen vor dem Immunsystem zu maskieren [101, 102]. Neue Studien zeigen allerdings, dass dieser Mechanismus keine zentrale Rolle bei der Inhibition der Vakzinierung durch maternale Antikörper spielt [103]. Ein weiterer Mechanismus der Interferenz zwischen Impfagens und maternalen Antikörpern ist das Cross-linking zwischen BCR und Fc-Rezeptor (siehe Abb. 5). Wenn der BCR der juvenilen Zelle ein Antigen erkennt und gleichzeitig maternale Antikörper gegen dieses Antigen vorliegen, bindet der maternale Antikörper an den Fc-Rezeptor dieser Zelle. Das Tyrosin-basierte hemmende Motiv (ITIM) des Fc-Rezeptors inhibiert also das Tyrosin-basierte aktivierende Signal (ITAM) des BCRs und es erfolgt weder eine Proliferation der B-Zelle [104] noch eine Sekretion der Antikörper [103].

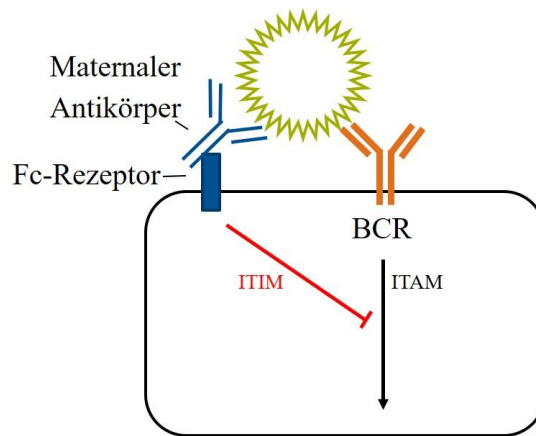


Abb. 5 Cross-linking zwischen BCR und maternalen Antikörpern

Bindet ein Antigen an einen BCR und es gibt maternale Antikörper zu diesem Antigen, wird die Immunantwort des BCR Signals gehemmt.

Modifiziert nach Niewiesk, 2014 [4]

Aus evolutionärer Sicht wurde dieser Mechanismus entwickelt, um eine Überreaktion der B-Zell Antwort zu verhindern und dadurch Energie zu sparen: Da der Organismus schon Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen hat, ist es nicht mehr nötig, eine erneute Immunantwort auszulösen [4]. Dieser Mechanismus ist sehr sinnvoll für bereits durchlaufene Immunantworten, aber da die maternalen Antikörper im Jungtier kontinuierlich verstoffwechselt werden, ist er in diesem Zusammenhang eher hinderlich [4].

2.3.3. Maternale Antikörper im Huhn

Im Huhn erfolgt die Übertragung der maternalen Antikörper über das Ei. Die Henne sezerniert dazu IgY aus dem Serum in den sich entwickelnden Follikel [90]. Die Menge an übertragenem IgY ist proportional zum IgY-Spiegel im Blut der Henne [105-107]. Die Menge an sezerniertem IgY wird mit ca. 10 mg/ml angegeben [90]. Neu synthetisierte antigenspezifische Antikörper werden mit einer Verzögerung von ca. 5 - 6 Tagen vom Blut in den Dotter übertragen [108]. Das IgY wird vermutlich durch einen rezeptor-vermittelten Prozess in den Follikel sezerniert, wobei der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist [90, 106]. Das Küken nimmt dieses IgY über die Dottersackmembran auf. Dieser Prozess beginnt an ET7 und die Menge an resorbiertem IgY steigert sich kontinuierlich bis zum Schlupf [105]. Die Aufnahme des IgY in den embryonalen Kreislauf erfolgt dabei analog zum Säuger pH-abhängig über den FcRY-Rezeptor [109, 110]. Während der FcRn-Rezeptor der Säugetiere starke Homologien mit MHC-Klasse-I-Komplex hat, gehört der FcRY-Rezeptor zur Gruppe der Mannose-Rezeptoren [94]. Der FcRY-Rezeptor bindet beide C_H4 Domänen der schweren Ketten und die Bindung der

Immunglobuline erfolgt im schwach sauren pH, wohingegen die Sezernierung basisches Milieu erfordert [94]. Der Embryo nimmt über den Aktiven Transport nur 10 % des maternalen IgY auf, die restlichen 90 % werden vermutlich proteolytisch verdaut [90]. Bei der Absorption des Dottersacks nach dem Schlupf gelangt zusätzliches Immunglobulin in den Darm und könnte dort eine wichtige Rolle für die Immunabwehr spielen [10].

Antikörper der Isotypen IgM und IgA werden dagegen nur zu sehr geringen Anteilen in den Embryo übertragen. Sie werden vom Eileiter in das Eiklar sezerniert. Der Embryo schluckt diese ab ET10-12 mit der Amnionsflüssigkeit ab und resorbiert sie im Darm [91].

Die Menge an maternalen Immunglobulinen steigt also in der Embryonalphase bis ca. zwei Tage nach dem Schlupf kontinuierlich an und fällt dann kontinuierlich ab. Gharaibeh et al. untersuchten die Halbwertszeit von maternalen Antikörpern im Huhn [5]. Dabei zeigen die meisten pathogen-spezifischen Antikörper eine Halbwertszeit von 4 - 5 Tagen (siehe Abb. 6).

Pathogen ²	Parent-flock ³	Days of age						
		0	5	10	15	20	25	30
AEV	3,839	405	29	2	0	0	0	0
AIV	1,910	668	37	2	1	0	0	0
CAV	9,283	1,985	108	18	1	1	0	0
IBDV	35,012	21,104	16,295	10,643	3,983	546	84	2
IBV	19,472	6,706	860	15	0	0	0	0
ILTV	3,146	209	10	2	2	1	0	0
MG	3,165	1,134	365	5	1	0	0	0
MS	4,881	828	21	3	1	0	0	0
NDV	8.5	5.9	4.9	3.5	3.5	3.1	2.4	1.1
Reo	2,761	790	41	4	0	0	0	0

¹All GMT were calculated by ELISA software except for NDV, where hemagglutination inhibition log₂ GMT titer was used.

²AEV = avian encephalomyelitis virus; AIV = avian influenza virus; CAV = chicken anemia virus; IBDV = infectious bursal disease virus; IBV = infectious bronchitis virus; ILTV = infectious laryngotracheitis virus; MG = *Mycoplasma gallisepticum*; MS = *Mycoplasma synoviae*; NDV = Newcastle disease virus; Reo = reovirus.

³Parent-flock geometric mean titer at the day they laid the eggs that hatched the broiler chicks used in this study (40 wk of age).

Abb. 6 Geometrische Mittelwerte¹ der Titer an maternalen Antikörpern gegen bestimmte Pathogene

Modifiziert nach Gharaibeh 2013 [5]

2.3.4. Studien zur Wirkung von maternalen Antikörper

Wie schon beschrieben, nutzt man die Vorteile der maternalen Antikörper, um Jungtiere aktiv vor Infektionen zu schützen. Andererseits hemmen maternale Antikörper auch die Auslösung einer Immunantwort im Jungtier [4]. Für die meisten Studien zu maternalen Antikörpern werden SPF (spezifisch pathogen freie) Tiere verwendet. Der Nachwuchs dieser SPF-Tiere hat keine maternalen Antikörper gegen ein bestimmtes Pathogen und an diesen Jungtieren kann dann die

eventuelle Minderung des Impferfolges durch die maternalen Antikörper die Folge sein [111, 112]. So zeigen Studien mit jungen Katzen, dass Impfungen gegen felines Herpesvirus in 44 % der Fälle unzureichende Antikörpertiter zur Folge haben, wenn zum Zeitpunkt der Impfung maternale Antikörper vorliegen [111]. In Hunden konnte gezeigt werden, dass hohe Antikörpertiter für Staupe erst bei einer Impfung ab dem 32. Lebenstag oder ab dem 40. Lebenstag für Parvovirose erzielt werden können [112]. Auch im Schwein gibt es Versuche zu maternalen Antikörpern, so haben Ferkel, deren Mütter gegen den untersuchten Influenza Subtyp geimpft waren, eine schwächere Immunantwort auf die Vakzination als Ferkel, deren Mütter nicht geimpft worden sind [113]. Dieses Phänomen ist auch bei Vögeln bekannt, wo maternale Antikörper den Impferfolg gegen Influenza ebenfalls deutlich mindern [99].

Die Interferenz maternaler Antikörper mit Vakzinen und der damit einhergehende verminderte Impferfolg ist also vielfach belegt, aber bisher gibt es nur sehr vereinzelt Versuche zu grundlegenden Wirkungen der maternalen Antikörper. Eine Studie von Koch et al. zeigt, dass maternale Antikörper die Reaktion des Jungtieres auf den Kontakt mit den Erregern der Mikrobiota dämpfen und so eine überschießende Reaktion des Immunsystems verhindern [114]. Aber vor allem im Nutztierbereich, wo Mutterschutzimpfungen angewandt werden, gibt es keine Untersuchungen zu zusätzlichen Effekten der maternalen Antikörper.

Ein möglicher Grund könnte sein, dass man für solche Studien maternale Tiere ohne Antikörper benötigt, deren Nachwuchs folglich sämtliche maternale Antikörper fehlen. Vorstellbar wäre dafür die Verwendung von gnotobiotischen Tieren, aber es konnte gezeigt werden, dass gnotobiotische Mäuse auch ohne externe Stimuli in der Lage sind, ein Antikörperrepertoire zu bilden [115]. Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung homozygoter Immunglobulin-Knockout Tiere. Im Schwein sind mehrere Ansätze zum B-Zell Knockout beschrieben, aber bisher gibt es keine Studien mit Tieren der F₁-Generation ohne maternale Antikörper [116, 117]. Da homozygote JH^{-/-} Hühner keine funktionalen Antikörper bilden, werden diese Tiere in der vorliegenden Arbeit als maternale Generation verwendet (siehe 2.2.3).

In früheren Versuchen wurden agammaglobulinämische Nachkommen auf die Produktion von IgM, IgY und IgA untersucht. Dabei zeigt sich, dass in diesen Tieren die Menge an gebildetem Immunglobulin sehr viel niedriger ist als in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 7) [118].

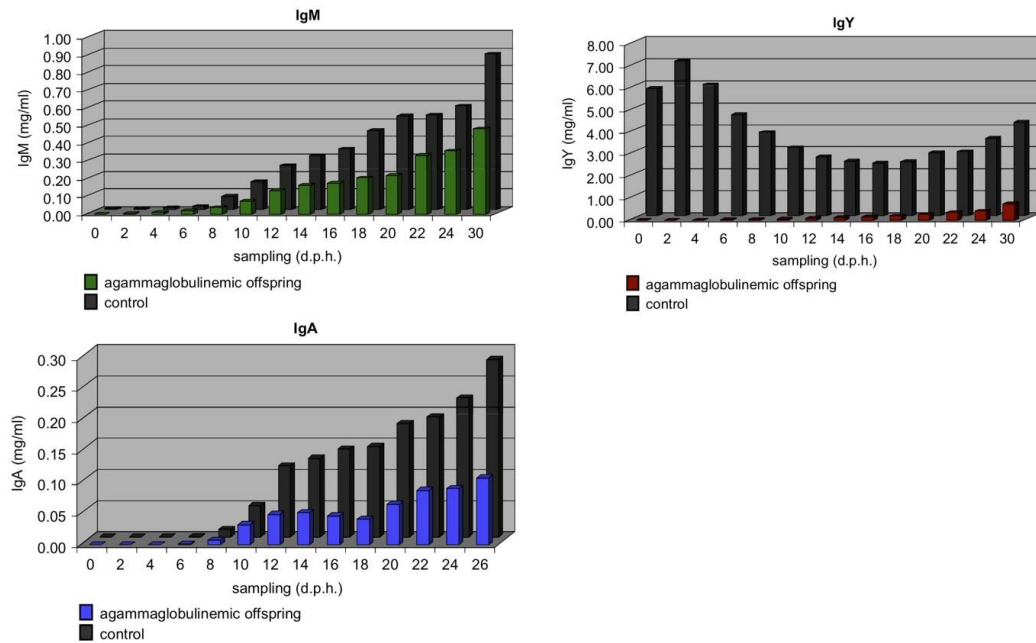


Abb. 7 Immunglobulintiter in Küken ohne maternale Antikörper

Titer von IgM, IgY und IgA in agammaglobulinämischen Küken zwischen Schlupf und 30. Lebenstag gegen eine Kontrollgruppe verglichen. Für alle Isotypen zeigen agammaglobulinämische Küken deutlich niedrigere Titer als die Kontrollgruppe.

Modifiziert nach Avian Immunology 2nd Edition

3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die vorliegende Arbeit analysiert, ob der Prozess des Gen-Rearrangements als auslösender Faktor für die Migration der B-Zellen in die Bursa nötig ist. Um diese Fragestellung anzusprechen, werden Tiere generiert, die sowohl einen Knockout der leichten Immunglobulinkette als auch einen Knockout der schweren Immunglobulinkette haben.

Des Weiteren werden auf Grundlage der JH-KO Tiere Küken ohne maternale Antikörper geschlüpft. Diese Küken (mat. neg.) werden auf allgemeine Parameter wie Körpergewicht und Immunglobulinbildung gegen eine Kontrollgruppe mit maternalen Antikörpern (mat. pos.) verglichen. Darüber hinaus werden die Tiere beider Gruppen mit KLH immunisiert, um die spezifische Immunantwort zu analysieren. Für die Analyse des Antikörperrepertoires im Huhn werden in dieser Arbeit PCRs zur Amplifikation der variablen Region der Immunglobuline etabliert und die NGS-Daten auf ihre Qualität geprüft.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Tiere und Tierhaltung

4.1.1. Herkunft und Zucht

Alle in dieser Arbeit verwendeten Hühner sind auf dem Hintergrund von Weißlegern. Sämtliche Tiere stammen aus eigener Zucht. Die Ausgangspopulation der genetisch modifizierten Tiere der Linien JH-KO [1] und IgL-KO [2] wurden bei der Firma Crystal Bioscience, Emeryville, USA generiert. Aus den heterozygoten Ausgangspopulationen wurden durch Anpaarung untereinander homozygote IgL^{-/-} und JH^{-/-} Tiere generiert. Diese Tiere dienten als Elterngeneration wie unter 5.1.1 beschrieben. Die unter 5.2 verwendeten Tiere entstanden durch die Anpaarung von JH^{-/-} Tieren mit WT-Tieren. Die Tiere wurden in Volieren mit Sitzstangen, Sandbad und Legenestern in Bodenhaltung gehalten. Sie erhielten ein der Altersstufe entsprechendes, kommerzielles Alleinfutter und Wasser *ad libitum*.

Tiere, die im Rahmen der durchgeführten Versuche getötet werden mussten, wurden fachgerecht euthanasiert.

Der Tierversuch wurde mit dem Aktenzeichen ROB-55.2-2532.VET_02-18-9 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

4.1.2. Inkubation von Eiern und Schlupf der Küken

Die Eier wurden in HEKA Favorite-Olymp Vorbrütern 18 Tage inkubiert. Die Inkubationsbedingungen betrugen dabei von Tag 1 bis Tag 18 37,8 °C bei 55 % relativer Luftfeuchtigkeit. Dazu wurden die Eier dreimal täglich gewendet. Ab Tag 18 wurde die Temperatur auf 37,2 °C gesenkt und das Wenden eingestellt. An diesem Tag wurden die Embryonen in einen Procon BSS Schlupfbrüter umgelegt. In diesem wurde am 20. Inkubationstag die relative Luftfeuchte auf 80 % erhöht. Während der Inkubation wurden unbefruchtete Eier und verstorbene Embryonen an ET7 und ET18 durch Schieren der Eier aussortiert.

4.2. Probenname und Immunisierung

4.2.1. Embryonale Blutentnahme

Material:

Schierlampe mit Eihalterung ²⁷

Tischinkubator ²²

Dremel 3000-15 Multifunktionswerkzeug ® ¹¹

Donau Diamanttrennscheibe 22 mm ¹¹

Insulinspritze 40 I.U. ¹⁵

Paraffinöl ²

EDTA Microvetten ²¹

Heparin ²⁰

RPMI-Medium ohne Zusätze ³

PBS (siehe 4.9.1)

22G Kanüle ¹⁵

Laborklebeband ³⁰

Durchführung:

Wesentliche Schritte der embryonalen Blutentnahme sind zur Veranschaulichung in Abb. 8 dargestellt.

Die Eier wurden in eine speziell angefertigte Halterung eingespannt, sodass durch das Licht der Schierlampe die Gefäße unter der Eischale erkannt werden konnten (A). Mit Bleistift wurde eine dreieckige Markierung (1 x 1 x 0,5 cm) über einem entsprechend geeigneten Gefäß gezeichnet. Dieses Dreieck wurde vorsichtig mithilfe der Trennscheibe des Dremels ® ausgeschnitten, ohne die darunter liegenden Strukturen zu verletzen (B). Die so präparierten Eier wurden bis zur Blutentnahme im Tischinkubator weiter bebrütet. Vor der Blutentnahme konnte das Dreieck vorsichtig ohne Ruptur der Eimembran mit der Kanüle entfernt werden (C). Durch Anbringen eines Tropfen Paraffinöls auf der Membran wurde diese durchsichtig und die unter der Eimembran verlaufenden Gefäße stellten sich klar dar. Danach konnte das Gefäß zur Blutentnahme punktiert werden (D). Zur Hemmung der Koagulation wurde entweder EDTA oder eine heparinbeschichtete Spritze verwendet. Für die Gerinnungshemmung durch Heparin wurde dieses mit RPMI-Medium auf 500 I.E./ml eingestellt. Vor der Blutentnahme wurde 1 ml dieser

Lösung mit der Spritze aufgezogen und wieder ausgestoßen, sodass Spritze und Kanüle beschichtet waren. Im Falle der Gerinnungshemmung mit EDTA wurden mit 1 ml PBS fünf EDTA Microvetten ausgewaschen und von dieser Lösung 6 μ l mit dem entnommenen Blut vermischt. Nach der Blutentnahme wurde das Dreieck wieder über der Entnahmestelle platziert und mit einem ca. 1 cm langen Stück Laborklebeband verschlossen. Danach wurde das Ei weiter inkubiert.

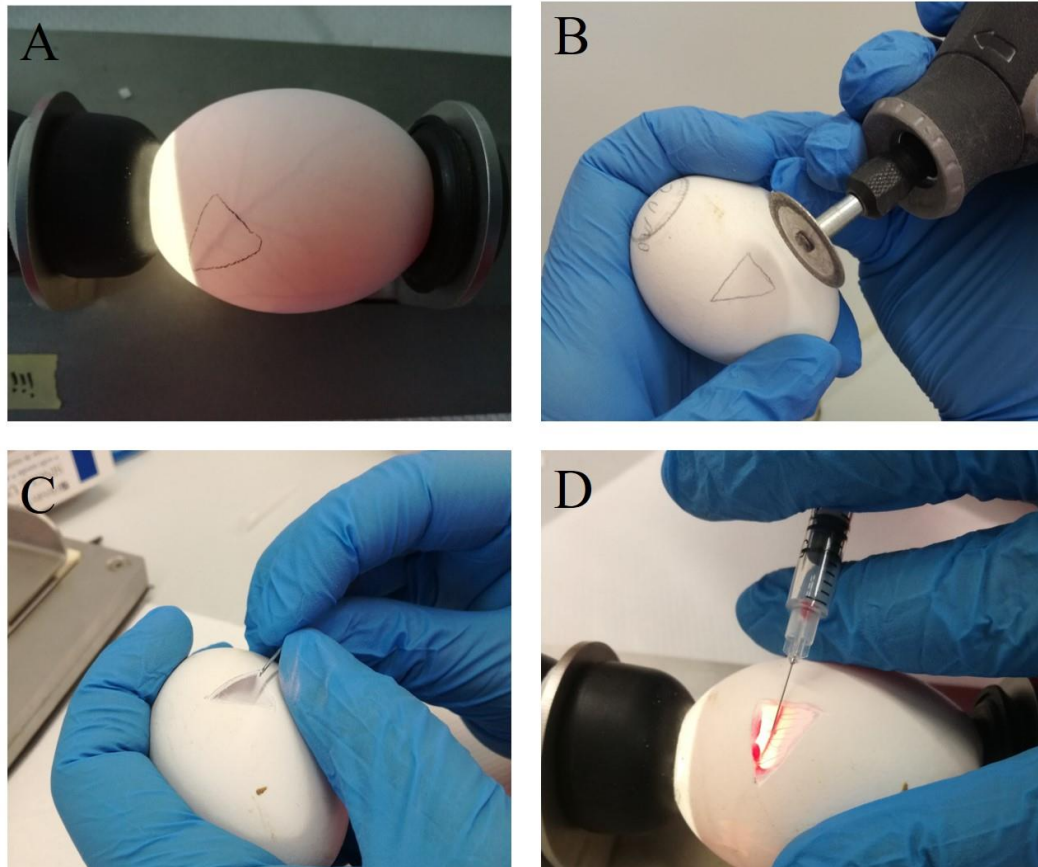


Abb. 8 Embryonale Blutentnahme

A – Einzeichnen eines Dreieck über einem geeigneten Gefäß mit Hilfe einer Schierlampe B – Ausfräsen des Dreiecks ohne Verletzung der Eimembran C – Entfernen der präparierten Schale mit einer Kanüle D – Blutentnahme aus dem Gefäß

4.2.2. Blutentnahme am geschlüpften Tier

Material:

70 % Ethanol

70 ml Ethanol absolut ⁹

30 ml Aqua dest.

27 G Kanüle ¹⁵

1 ml Spritze ¹⁵

EDTA Microvetten ²¹

Heparin ²⁰

RPMI-Medium ohne Zusätze ³

Durchführung:

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktation der Vena jugularis dextra. Die Haut wurde vor der Entnahme mit 70 % Ethanol desinfiziert und das Gefieder gescheitelt. Zur Hemmung der Koagulation wurden entweder EDTA Microvetten oder eine heparinbeschichtete Spritze wie unter 4.2.1 beschrieben verwendet.

4.2.3. Immunisierung mit Keyhole limpet hemocyanin

Material:

KLH ²³

Freund's Adjuvant, Incomplete ²³

3 ml Luer-Lock Spritzen ¹⁵

Female Luer Adapter ¹⁰

Steriles PBS (siehe 4.9.1)

22 G Kanülen ¹⁵

70% Ethanol (siehe 4.2.2)

Durchführung:

KLH (Keyhole limpet hemocyanin) wird in der Immunologie häufig als Trägerantigen verwendet, da es eine T-Zell abhängige Immunantwort auslöst. Hier wurde es verwendet, um die Fähigkeit, Antikörper gegen ein spezifisches Antigen zu bilden, zu untersuchen.

Die Haut wurde an der Einstichstelle vor der Injektion mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Jedes Tier erhielt 300 µg KLH am Übergang von kranialem zum

mittleren Drittel des Brustmuskels *intramuskulär* appliziert. Die benötigte Menge an KLH wurde mit sterilem PBS auf ein Volumen von 200 µl eingestellt und kurz vor Applikation mit dem gleichen Volumen Freund's Adjuvant Incomplete zu einer homogenen Suspension vermischt.

4.2.4. Organentnahme

4.2.4.1. Organentnahme für histologische Proben

Material:

Tissue Tek ²⁶

Peel-away Schälchen (16 x 16 x 16 mm) ²⁶

Flüssiger Stickstoff ²⁹

Aluminiumfolie ²⁸

Durchführung:

Nach der Euthanasie der Tiere wurde die Körperhöhle eröffnet und die benötigten Organe entnommen. In einem Peel-away Schälchen wurde Tissue Tek vorgelegt, das jeweilige Organ darauf gebettet und mit Tissue Tek bedeckt. Die Probe wurde dann langsam an der Oberfläche des flüssigen Stickstoffs eingefroren. Zur Langzeitaufbewahrung der Proben wurden diese zusätzlich in Alufolie gewickelt und bei -80 °C gelagert.

4.2.4.2. Präparation von Organen zur Gewinnung von RNA

Wurden Proben zur Extraktion von RNA benötigt, wurden die entnommenen Organe sofort in RNAlater²³ überführt. Dabei wurde das mindestens 5-fache Volumen an RNAlater in Relation zur Organgröße verwendet. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C gelagert und dann bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

4.3. Isolation genomischer DNA aus Hühnerblut

Material:

EDTA Blut

Frisch oder gelagert bei -20 °C

STM Puffer

64 mM Sucrose ²

20 mM Tris-Cl, pH 7,5 ²

10 mM MgCl ²

0,5 % Triton X-100 ²

Lagerung bei 4 °C

TEN Puffer

10 mM Tris-Cl, pH 8,0 ²

1 mM EDTA ²

10 mM NaCl ²

Lagerung bei Raumtemperatur

Pronase E 20 mg / ml

20 mg Pronase E ²³

Ad 1ml H₂O

Adhäsive Folie ²¹

96-Deepwell Megablock ²¹

1,5 ml Reaktionsgefäße ²⁸

Papiertuch ⁹

Durchführung:

Bei großer Probenanzahl erfolgte die Isolation in einem 96-Deepwell Megablock, andernfalls in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Die Blutproben wurden kurz gevortext. Für jede Probe wurde 200 µl STM Puffer vorgelegt, 1 µl EDTA Blut zugegeben und gevortext. Nach einer Zentrifugation bei 1000 x g für 5 min wurde der Überstand abgekippt. Um den verbliebenen Puffer restlos zu entfernen, wurde der Megablock mehrmals auf ein frisches Papiertuch geklopft. Im Anschluss wurde pro Well 400 µl TEN Puffer versetzt mit 100 µg/ml Pronase E zugegeben. Der Megablock wurde mit einer Folie verschlossen und eine Stunde bei 37 °C mit 250 rpm

inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung der Pronase für 20 Minuten bei 65 °C. 2 µl dieser DNA wurden im Anschluss je PCR- Reaktion verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

4.4. RNA Isolation aus verschiedenen embryonalen Geweben

Alle Arbeiten wurden mit besonderer Sorgfalt unter Verwendung von RNase-freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt.

4.4.1. RNA Isolation aus der Cäcaltonsille

Material:

Relia Prep RNA Tissue Miniprep System (fibröses Gewebe) ¹⁹

Isopropanol ²

innuSPEED Lysis Tubes A ¹

SpeedMill Plus Homogenisator

Durchführung:

Eine Cäcaltonsille wurde mit 500 µl LBA-Puffer mit 1:50 1-Thioglycerol versetzt und in ein innuSPEED Lysis Tube A gegeben. Anschließend wurde es im SpeedMill Homogenisator für 3 x 30 sek gekühlt homogenisiert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten strikt gemäß dem Herstellerprotokoll. Gemäß diesem Protokoll wurde auch ein DNase Verdau durchgeführt. Die RNA Konzentration wurde mit dem NanoDrop bestimmt.

4.4.2. RNA Isolation aus PBMCs

Material:

PBMCs aus peripherem Blut (siehe 4.2.2.1)

frisch oder pelletiert in RNAlater bei -80 °C gelagert

ReliaPrep RNA Cell Miniprep System ¹⁹

Isopropanol ²

Durchführung:

Die Durchführung erfolgte wie im Herstellerprotokoll beschrieben mit den größtmöglich aufgeführten Volumina. Auch hier erfolgte ein im Protokoll beschriebener DNase Verdau. Die RNA wurde nach der Isolation in 30 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und dann per NanoDrop gemessen.

4.5. cDNA Synthese

Material:

RNA

GoScript Reverse Transcription Mix, Random Primers A2800 ¹⁹

GoScript Reverse Transcription System A5003 ¹⁹

Aqua bidest. (nukleasefrei) ²

Durchführung:

Im Anschluss an die RNA Isolation wurde die gewonnene RNA mit einer Reversen Transkriptase in eine komplementäre ‚copy‘ DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese ist stabiler als RNA und kann als Matrize für verschiedene PCRs eingesetzt werden. Zur Synthese der cDNA können z.B. Random Hexamer Primer verwendet werden. Diese Primer sind sechs Basenpaare lang und bestehen aus allen möglichen Kombinationen der vier Nukleinbasen. Dadurch werden alle Abschnitte der RNA in cDNA umgeschrieben. Bei der Amplifikation der variablen Region der schweren Immunglobulinkette (siehe 5.3) wurde isotypspezifische cDNA synthetisiert. Dabei wurde der reverse Primer so gewählt, dass er in der konstanten Region der Immunglobuline liegt und somit für IgM, IgY und IgA verschieden ist. Der forward Primer liegt in der Leader-Sequenz des V-Segments und wurde für alle Reaktionen verwendet. Eine Aufstellung der Primer, die für die isotypspezifische cDNA verwendet wurden, ist in Tabelle 1 zu sehen.

Für alle Reaktionen wurden 400 ng RNA eingesetzt. Die Synthese beider cDNA Varianten erfolgte strikt gemäß dem Protokoll des Herstellers. Nach der Synthese wurde die cDNA 1:2 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und es wurden 2 µl je PCR-Reaktion eingesetzt.

Lokus	Orientierung	Interne Nummer	Sequenz 5'-3'	Länge des Amplikons (bp)
IgM, IgY, IgA	forward	715	atggcggccgtgacgttgga	
IgM	reverse	716	ggagcacagaaccaacgggaa	511
IgY	reverse	719	cactccgtccaccaaccattcgacc	798
IgA	reverse	770	gccgtctcttgaggataatt	1392

Tabelle 1 Übersicht der Primer für die isotypspezifische cDNA Synthese

4.6. Polymerase Kettenreaktion

4.6.1. Genotypisierungs-PCRs

Die Polymerase Kettenreaktion dient dazu, ein bestimmtes DNA-Segment mithilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase zu vervielfältigen. Durch die Verwendung sequenzspezifischer Primer wird so im Zuge einer Genotypisierung auf das Vorkommen verschiedener Allele im Genom des Tieres untersucht. Für die Genotypisierungen wurde eine Taq-Polymerase verwendet.

Material:

5x FIREPol Master Mix ²⁴

Aqua bidest. (nukleasefrei) ²

96-Well PCR Platten ²⁸

Adhäsive Folie ²¹

Thermocycler ⁶

Primer ¹²

Lokus	Interne Nummer	Orientierung	Sequenz 5'-3'	Länge des Amplikons (bp)
JH-KO	13011	forward	gccccaaatggcccaaaac	
JH-KO	13012	reverse	agtgacaacgtcgagcacagct	382
JH-WT	13011	forward	gccccaaatggcccaaaac	
JH-WT	13013	reverse	atggggccacgggaccgaa	359

IgL-KO	13009	forward	agatctctctctcccatcctg	
IgL-KO	15092	reverse	ggttcgaaatgaccgaccaagc	618
IgL-WT	15093	forward	ggctgcgatcgccatggcctgg gctcctctcctc	
IgL-WT	15094	reverse	gagcagatgaggagctgccagc	709
W-Chromosom	12029	forward	ctatgcctaccacmttctatttgc	
W-Chromosom	12030	reverse	agctggayttcagwscatcttct	375
Z-Chromosom	12027	forward	aagcatagaaacaatgtggggac	
Z-Chromosom	12028	reverse	aactctgtctggaaggactt	250

Tabelle 2 Auflistung der verwendeten Primer zur Genotypisierung und zum Sexing von Tieren

Durchführung:

Ansatz für eine PCR-Reaktion

5x FIREPol Master Mix	4 µl
Forward Primer (5 pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (5 pmol/µl)	1 µl
Genomische DNA	2 µl
H ₂ O (nukleasefrei)	12 µl
Gesamt	20 µl

Die PCR Bedingungen für die Genotypisierungen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Schritt	Zyklus	Phase	Temperatur	Dauer
1		Initial Denaturation	95 °C	3 min
	2a	Denaturation (35 x)	95 °C	30 sek
	2b	Annealing (35 x)	60 °C//63°C *	30 sek
	2c	Elongation (35 x)	72 °C	1 min
3		Finale Elongation	72 °C	5 min
4		Store	6 °C	unendlich

Tabelle 3 PCR Bedingungen für Genotypisierungs-PCRs

*Die Annealingtemperatur entspricht bei der IgL-WT PCR 63 °C, bei allen anderen Genotypisierungen beträgt sie 60 °C.

4.6.2. Geschlechtsbestimmung per PCR

Um frühzeitig das Geschlecht eines Tieres sicher bestimmen zu können, wurden Sexing PCRs verwendet. Dabei werden das W- und das Z-Chromosom in einer Multiplex-PCR amplifiziert. Weibliche Hühner weisen beide Chromosomen auf, männliche haben dagegen zwei Z-Chromosomen. Die Primer für beide Chromosomen sind in Tabelle 2 aufgeführt, Tabelle 4 zeigt die PCR Bedingungen der Sexing PCR.

Ansatz für eine PCR-Reaktion

5x HOT FIREPol Multitplex Mix ²⁴	4 µl
W- Chromosom Forward Primer (5 pmol/µl)	1 µl
Z- Chromosom Forward Primer (5 pmol/µl)	1 µl
W- Chromosom Reverse Primer (5 pmol/µl)	1 µl
Z- Chromosom Reverse Primer (5 pmol/µl)	1 µl
Genomische DNA	2 µl
H ₂ O (nukleasefrei)	10 µl
Gesamt	20 µl

Schritt	Zyklus	Phase	Temperatur	Dauer
1		Initial Denaturation	95 °C	12 min
	2a	Denaturation (35 x)	95 °C	30 sek
	2b	Annealing (35 x)	56 °C	30 sek
	2c	Elongation (35 x)	72 °C	30 sek
3		Finale Elongation	72 °C	5 min
4		Store	6 °C	unendlich

Tabelle 4 PCR Bedingungen für das Sexing von Hühnern

4.6.3. Amplifikation der variablen Region von Immunglobulinen

Um das Antikörperrepertoire im Huhn mittels Next-Generation-Sequencing analysieren zu können, wurden PCRs etabliert, die die variable Region von leichter und schwerer Immunglobulinkette amplifizieren. Dazu wurde eine Polymerase mit *proof reading* Funktion verwendet.

Material:

cDNA (siehe 4.5)

Q5 High-Fidelity DNAPolymerase¹⁸

Primer¹²

dNTPs¹⁸

Aqua bidest. (nukleasefrei)²

Thermocycler

Durchführung:

Ansatz für eine PCR-Reaktion:

0,25 µl Q5 Polymerase
2,5 µl Forward-Primer (5 pmol/µl)
2,5 µl Reverse-Primer (5 pmol/µl)
5 µl Q5 Puffer
0,5 µl dNTPs
2 µl DNA-Template
12,25 µl H₂O (nukleasefrei)
Gesamt 25 µl

Die verwendeten Primer zur Amplifikation der variablen Region von schwerer und leichter Kette sind in Tabelle 5 aufgeführt. Je nach Vorgaben der Sequenzierungsfirma wurden diese Primer mit verschiedenen Barcodes oder Adaptern versehen. So war für die Sequenzierung durch das NGSelect Amplicon 2nd PCR Programm von Eurofins Genomics Germany GmbH die Verwendung von Illumina Adaptern nötig. An diese universellen Illumina Nextera Transposase Adapter wurden durch die Firma im Rahmen einer zweiten PCR die zur individuellen Kennzeichnung der Probe nötigen Indices hinzugefügt. Für den forward-Primer war dieser Adapter 5'-tcgtcggcagcgatgtgtataagagacag-3' und

für den reverse-Primer 5'-gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacag-3'. Im Falle der Sequenzierung über Novogene (UK) Company Ltd. wurden die Barcodes wie in Tabelle 6 beschrieben den Proben zugeordnet. Die Barcodes wurden 5' an die Primer aus Tabelle 5 angehängt und dann individuell zum Ansatz jeder PCR der jeweiligen Probe verwendet. Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation der leichten Kette sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Die Amplifikation der variablen Region der schweren Kette erfolgte mit einer 2-Step PCR mit 10 sek Annealing und Elongation. Die Verwendung der verschiedenen Adapter und Barcodes haben dabei keinen Einfluss auf die PCR-Bedingungen.

Lokus	Interne Nummer	Orientierung	Sequenz 5'-3'	Länge des Amplikons (bp)
IgH	715	forward	atggcgccgtgacgttgga	
IgH	779	reverse	ttcgggtcccgtggcccat	360 bp
IgL	717	forward	atggcctgggctcctctc	
IgL	718	reverse	taggacggtcagggtgtc	350 bp

Tabelle 5 Primer zur Amplifikation der variablen Region der Immunglobulinketten

Probenname	forward-Barcode	Barcode-Sequenz 5'-3'	reverse-Barcode	Barcode-Sequenz 5'-3'
IgM-Tier 1-Tag 3	HT18	acacagaa	HT21	acgctcga
IgM-Tier 2-Tag 3	HT18	acacagaa	HT22	acgtatca
IgM-Tier 3-Tag 3	HT18	acacagaa	HT23	actatgca
IgM-Tier 1-Tag 28	HT19	acagcaga	HT24	agagtcaa
IgM-Tier 2-Tag 28	HT19	acagcaga	HT25	agatcgca
IgM-Tier 3-Tag 28	HT19	acagcaga	HT26	agcaggaa
IgL-Tier 1-Tag 3	HT19	acagcaga	HT21	acgctcga
IgL-Tier 2-Tag 3	HT19	acagcaga	HT22	acgtatca
IgL-Tier 3-Tag 3	HT19	acagcaga	HT23	actatgca
IgL-Tier 1-Tag 28	HT20	acctccaa	HT24	agagtcaa

IgL-Tier 2-Tag 28	HT20	acctccaa	HT25	agatcgca
IgL-Tier 3-Tag 28	HT20	acctccaa	HT26	agcaggaa

Tabelle 6 Zuordnung der Barcodes zur individuellen Probenkennzeichnung für die Sequenzierung mit Novogene (UK) Company Ltd.

Schritt	Zyklus	Phase	Temperatur	Dauer
1		Initial Denaturation	98 °C	30 sek
	2a	Denaturation (35 x)	98 °C	10 sek
	2b	Annealing (35 x)	67 °C	30 sek
	2c	Elongation (35 x)	72 °C	20 sek
3		Finale Elongation	72 °C	2 min
4		Store	6 °C	unendlich

Tabelle 7 PCR Bedingungen für die Amplifikation der variablen Region der leichten Kette

4.7. Agarose-Gelelektrophorese

Material:

PCR-Amplikon

10X Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

242 g Tris ²

100 ml 0,5M EDTA ²

57,1 ml Essigsäure ²

Ad 1 l Aqua bidest.

Für eine 1 X Lösung wurde der 10X Stock 1:10 mit Aqua dest. verdünnt

50X Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

108 g Tris ²

55 g Borsäure ²

900 ml KCl ²

40 ml KH₂PO₄ ²

Ad 1 l Aqua bidest.

Für eine 1X Lösung wurde der 50X Stock 1:50 mit Aqua dest. verdünnt

Low-molecular-Agarose ²

20.000X PEQ-Green DNA binding Dye²⁸

1:20.000 Verdünnung des Stocks mit Aqua bidest.

Orange G Loading Dye

60 ml Glycerol²

12 ml 0,5M EDTA²

100 mg Orange G²⁶

Ad 100 ml Aqua bidest.

1kb Plus DNA Ladder gebrauchsfertig

4,5 µl 1kb Plus DNA Ladder²⁶

25 µl 6X Orange G Loading Dye

120,5 µl Aqua bidest.

Durchführung:

Für eine Gelelektrophorese zur Auswertung einer PCR wurde eine 1 %ige Lösung der Agarose in 1X TBE/TAE-Puffer hergestellt. Dies wurde in einer Mikrowelle so lange erhitzt, bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Nach Abkühlen auf Handwärme wurde dem flüssigen Gel 4 µl auf 100 ml 1X PEQ-Green hinzugefügt. Danach konnte das Gel in den mit Probenkämmen präparierten Schlitten gegossen werden. Nach dem vollständigen Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Schlitten in die Elektrophoresekammer eingelegt und mit 1X TBE/TAE-Puffer vollständig bedeckt. TAE Puffer wurde verwendet, wenn nach der Gelelektrophorese ein Fragment aus dem Gel aufgereinigt werden sollte. Für alle anderen Gele wurde TBE Puffer verwendet. Die PCR-Amplikons wurden 1:6 mit Orange G Loading Dye versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Zum Gellauf wurde eine Spannung von 100 bis 120 V angelegt. Nach ca. 1,5 h wurde das Gel mit dem Geldokumentationssystem Quantum ST5 ausgewertet. Anhand der DNA-Ladder wurde die Größe des amplifizierten Fragments überprüft.

4.8. Aufreinigung des PCR-Amplikons

Falls PCR-Produkte zum Sequenzieren geschickt werden sollten, wurden sie vor dem Versand zum Sequenzieren aufgereinigt. Im Falle des Auftretens von unspezifischen Banden auf dem Gelelektrophoresebild, wurde das Fragment der gewünschten Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt. Diese Aufreinigung erfolgte mit dem E.Z.N.A. Kit²⁸ gemäß Herstellerangaben. Falls die

Gelektrophorese eine einzelne Bande von korrekter Größe zeigte, wurde das PCR-Amplikon direkt mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-up System ¹⁹ aufgereinigt und versandt.

4.9. Isolation von Leukozyten

4.9.1. Isolation von PBMCs aus peripherem Blut

Material:

Frisches, gerinnungsgehemmtes Blut

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2

8,00 g Natriumchlorid (NaCl) ²

1,15 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) ²

0,2 g Kaliumchlorid (KCl) ²

0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) ²

Ad 1 l Aqua dest.

Einstellen des pH mit HCl und NaOH auf 7,2

Zur Herstellung von sterilem PBS wurde die Lösung autoklaviert

Biocoll Separating Solution ³

FACS-Röhrchen ²¹

Eis

Durchführung:

Das frische Blut wurde 1:2 mit PBS verdünnt und das 1,5 fache dieses Volumens an Biocoll Separating Solution in einem FACS-Röhrchen vorgelegt. Im nächsten Schritt wurde das verdünnte Blut langsam auf die Biocoll Solution geschichtet. In der anschließenden Zentrifugation bei 650 x g für 12 min bei RT und mit langsamer Beschleunigung und ohne Bremswirkung wurde ein Dichtegradient der Zellen erzeugt. Die PBMCs des Blutes sammeln sich dabei in der Interphase und konnten nach der Zentrifugation abgenommen werden. Danach wurden sie in 3 ml eiskaltem PBS gewaschen und bei 222 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert.

4.9.2. Gewinnung von Leukozyten aus der Milz

Material:

1 ml Spritze¹⁵

Präparationsbesteck¹³

PBS (siehe 4.9.1)

Biocoll Separating Solution³

FACS-Röhrchen²¹

Eis

Durchführung:

Die Embryonen wurden euthanasiert und die Milz wurde entnommen. Je nach Versuch wurden verschieden viele Milzen in FACS-Röhrchen in 1 ml PBS auf Eis gepoolt und gelagert, bis alle Organe präpariert waren. Danach wurden die Organe homogenisiert, indem die Suspension mit der Spritze aufgezogen und mit Druck gegen den Boden des FACS-Röhrchens wieder ausgestoßen wurde. Dieser Vorgang wurde ca. 10x wiederholt, so lange, bis makroskopisch keine Gewebestücke mehr zu sehen waren. Danach wurde die Suspension in einem zweiten FACS-Röhrchen auf 2 ml Biocoll Separating Solution geschichtet, und wie unter 4.9.1 beschrieben, zentrifugiert und gewaschen.

4.9.3. Isolation von Leukozyten aus der Bursa

Material:

Präparationsbesteck¹³

1 ml Spritze¹⁵

Biocoll Separating Solution³

PBS (siehe 4.9.1)

Petrischale²¹

Nylon Cell Strainer 100 µm Porengröße²³

Eis

Durchführung:

Nach Präparation der Bursen wurden diese einzeln oder gepoolt in 1 ml PBS auf Eis gelagert. Nach der Präparation aller Bursen wurden diese in das Sieb eines Cell Strainers gegeben und auf einer sterilen Petrischale mit dem Spritzenstempel der

1 ml Spritze homogenisiert. Unter Zugabe eines weiteren Milliliters PBS wurde das Sieb gewaschen und die Zellsuspension schrittweise auf 2 ml Biocoll Separating Solution geschichtet. Die anschließende Dichtegradientenzentrifugation erfolgte wie unter 4.9.1 beschrieben. Die Zellen wurden danach ebenso in 3 ml PBS gewaschen und pelletiert.

4.10. Isolation von IgY aus dem Eidotter

Material:

TBS-Puffer pH 7,3

6,05 g Tris²

43,50 g NaCl²

1,00 g NaN₃²

Ad 5 l Aqua dest.

10 % Dextransulfatlösung

10 g Dextransulfat²

Ad 100 ml Aqua dest.

1M Calciumchloridlösung

7,40 g Calciumchlorid-Dihydrat²

Ad 50 ml Aqua dest.

Dialysepuffer pH 7,8

23,00 g Na₂HPO₄²

45,00 g NaCl²

1,65 g KH₂PO₄²

Ad 5 l Aqua dest

Ammoniumsulfat²

Dialyseschläuche Durchmesser 2 cm⁸

Greiner Zentrifugenröhrchen³

Faltenfilter⁸

Ultrazentrifuge

Magnetrührer und Rührfische

Durchführung:

Das Eigelb wurde vom Eiweiß getrennt. Der Dotter wurde gewogen und 1:10 mit

TBS verdünnt. Diese Suspension wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend bei 3000 x g 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,4 ml/g Dotter 10 %iger Dextransulfatlösung gemischt und 15 min auf dem Magnetrührer gerührt. Danach wurde 1 ml/g 1M Calciumchloridlösung zur Gerinnung der Eiweiße zugegeben. Diese Lösung wurde wieder 15 min bei RT gerührt und anschließend bei 3000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde durch den Faltenfilter filtriert und das Filtrat in einen zuvor in Aqua dest. gewässerten Dialyseschlauch überführt. Über Nacht wurden diese Lösung bei 4 °C in 5 l TBS Puffer pro maximal 45g Dottermasse dialysiert. Am nächsten Tag wurde das Dialysat gewogen und massenanteilig 26 % Ammoniumsulfat zugegeben, wodurch die IgY Moleküle gefällt wurden. Dies wurde gerührt, bis das Ammoniumsulfat nach ca. 30 min komplett gelöst war und die Suspension wurde anschließend bei 3000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit möglichst wenig TBS-Puffer gelöst. Diese Suspension wurde in einen zuvor in Aqua dest. gewässerten Dialyseschlauch überführt und über Nacht gegen TBS bei 4 °C auf dem Magnetrührer dialysiert. Am nächsten Morgen wurde der Dialyseschlauch in 5 l Dialysepuffer überführt und tagsüber bei 4 °C gerührt. Dasselbe geschah über Nacht nochmals mit frischem Dialysepuffer. Am darauffolgenden Tag konnte die Proteinkonzentration im NanoDrop gemessen werden. Als Blank wurde der Dialysepuffer verwendet.

4.11. qRT-PCR auf die Expression von IgA

Material:

cDNA (Random Hexamers, 1:10 verdünnt siehe 4.5)

Aqua bidest. (nukleasefrei) ²

GoTaq qPCR Master Mix ¹⁹

96-Well qPCR Platte ³²

Abdichtfolie ³²

qRT-PCR Primer ¹²

qRT-PCR Gerät ⁶

CFX Manager software ⁶

Durchführung:

Die qRT-PCR wurde verwendet, um die IgA Expression in der Cäcaltonsille zu untersuchen. Dabei wurde jeder Ansatz zweifach pipettiert. Die RNA wurde wie unter 4.4.1 beschrieben isoliert, die cDNA wie unter 4.5 beschrieben mit Random Hexamer Primers synthetisiert. Die Primer für IgA spezifische Antikörper wurden in der konstanten Region gewählt. Diese Primer wurden freundlicherweise vom Institut für Tierphysiologie der LMU München zur Verfügung gestellt. Der Forward Primer hatte die Sequenz 5'-cgcccccttcggtctacgt-3', der Reverse Primer 5'-cgaaatcggttggtttgttg- 3'. Das Amplikon hatte dadurch eine Größe von 139 bp. Als Referenzgen wurde die 18S ribosomale RNA verwendet. Der Mastermix wurde nach folgendem Schema hergestellt:

Ansatz für eine Probe:

GoTaq MasterMix	10 µl
Forward Primer (5 pmol/µl)	1,5 µl
Reverse Primer (5 pmol/µl)	1,5 µl
Nukleasefreies Wasser	7 µl
cDNA Template	5 µl
Gesamt	25 µl

Nach sorgfältigem Mischen wurden die PCR-Ansätze in eine 96-Loch-qPCR Platte pipettiert und mit einer durchsichtigen selbsthaftenden Folie gut abgedichtet. Für die qRT-PCR wurde eine Hot-Start Polymerase verwendet, welche erst durch einen initialen Erhitzungsschritt aktiviert wird. Tabelle 8 zeigt das 2-Step Temperaturprotokoll für die qRT-PCR auf IgA.

Schritt	Zyklus	Phase	Temperatur	Dauer
1		Hot-Start Aktivierung	95 °C	2 min
	2a	Denaturation (40 x)	95 °C	3 sek
	2b	Annealing (40 x)	59 °C	30 sek

Tabelle 8 qRT-PCR Bedingungen zur Amplifikation von IgA

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte anhand der Δ -CT Methode. Dabei wurden von den gemessenen CT-Werten der IgA-PCR die Werte der 18S-PCR subtrahiert (Δ CT-Wert). Diese Werte wurden dann für beide Gruppen gemittelt. Zur Ermittlung des $\Delta\Delta$ CT-Wert, der die relative Expressionsänderung angibt, wurde die

Kontrollgruppe als Kalibrator verwendet und folglich = 0 gesetzt. Der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert der Versuchsgruppe wurde durch Subtraktion des ΔCT -Wert der Kontrollgruppe von dem ΔCT -Wert der Kontrollgruppe errechnet. Die Expression wurde im nächsten Schritt durch die Formel $E = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ermittelt und dargestellt.

4.12. Magnetischer Sort von B-Zellen (MACS)

Material:

PBMCs (siehe 4.9.1)

Stereptavidin-Beads ¹⁷

MACS Midi LS+ Säule ¹⁷

MACS Separator ¹⁷

Fluo-Puffer gelagert bei 4 °C

5 g Bovines Serumalbumin ²

50 mg NaN_3 ²

Ad 500 ml PBS (siehe 4.9.1)

Labelling-Puffer

400 μl 0,5M EDTA ²

Ad 100 ml PBS (siehe 4.9.1)

Sterile Filtriereinheit zum Entgasen 2 μm ²⁸

Separations-Puffer

400 μl 0,5M EDTA ²

0,5 g Bovines Serumalbumin ²

Ad 100 ml PBS (siehe 4.9.1)

Sterile Filtriereinheit zum Entgasen 2 μm ²⁸

Antikörper (siehe Tabelle 9)

Lebend-Tot-Farbstoffe (siehe Tabelle 10)

Durchflusszytometer (Attune NxT ²⁶)

Durchführung:

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Leukozyten wurden entweder heparinisiertes Blut, Bursen oder Milzen von Embryonen an ET12 verwendet. Die wie unter 4.9 beschrieben isolierten und gewaschenen Leukozyten wurden in 500 μl des biotinylierten Bu1 Antikörpers mit einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$

für 15 min auf Eis inkubiert und danach mit 1 ml Labelling-Puffer gewaschen und zentrifugiert (350 x g, 10 min, 4 °C). Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt und anschließend wurden die Zellen in 180 µl Labelling-Puffer resuspendiert und mit 20 µl der Streptavidin-Beads versetzt. So wurden die Zellen 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Labelling-Puffer zugegeben und die Zellen gewaschen und zentrifugiert bei 350 x g für 10 min bei 4 °C. In der Zwischenzeit wurde eine MACS LS+ Midi Column in den Separator eingesetzt und mit 3 ml Separations-Puffer befüllt. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation in 1 ml Separations-Puffer aufgenommen und auf die Säule pipettiert. Magnetisch markierte Zellen wurden so an die Säule gebunden. Nicht markierte Zellen wurden als negativer Durchfluss zur Kontrolle aufgefangen. Die Säule wurde anschließend mit 3x 4 ml Separations-Puffer gewaschen. Danach wurde die Säule aus dem Magnet genommen und die vorher gebundenen Zellen wurden mit 5 ml Separations-Puffer eluiert. Bei Verwendung einer zweiten Säule wurde diese wiederum mit 3 ml Separationspuffer vorbereitet und die Zellen nach der Zentrifugation bei 350 x g für 10 min bei 4 °C in 1 ml Separationspuffer resuspendiert und auf die zweite Säule gegeben. Die Säule wurde ebenso mit 3 x 4 ml Separationspuffer gespült und die Zellen anschließend mit 5 ml Separationspuffer eluiert.

Um den Erfolg der Sorts zu überprüfen, folgte eine durchflusszytometrische Analyse aller Proben. Als Kontrolle wurden die isolierten Leukozyten ohne Behandlung sowie der negative Durchfluss mitgeführt. Dafür wurden die Zellen bei 350 x g für 10 min bei 4 °C pelletiert und mit dem Fixable Viability Dye eFluor 780 1:1000 in Fluo-Puffer 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Fluo-Puffer und pelletieren (700 x g, 2 min, 4 °C) wurden die Zellen mit einem Bu1 – Alexa Fluor Antikörper der Konzentration 1,25 µg/ml 20 min auf Eis gefäbt. Im letzten Schritt wurden die Zellen wiederum mit 1 ml Fluo-Puffer gewaschen (700 x g, 4 °C, 2 min) und dann in 3 ml Fluo Puffer mit dem Durchflusszytometer analysiert.

4.13. Durchflusszytometrie

Material:

PBMCs (siehe 4.9)

Primäre und sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 9)

Lebend-Tot-Farbstoff (siehe Tabelle 10)

Fluo-Puffer (siehe 4.12)

96-Well Rundlochplatte, unsteril²¹

Zählkammer nach Neubauer²⁸

Durchflusszytometer (Attune NxT²⁶)

Eis

Durchführung:

Die gewaschenen Leukozyten wurden bei Bedarf gezählt. Dazu wurden sie 1:100 in Trypanblau verdünnt und 10 µl dieser Lösung auf die Zählkammer nach Neubauer pipettiert und so die Anzahl der Zellen pro ml errechnet. Danach wurden die Zellen auf eine Rundlochplatte ausplattiert mit einer Dichte von maximal 1×10^6 Zellen pro Well. Die Zellen wurden bei 726 x g für 1 min zentrifugiert und der Überstand mit einer zügigen Kippbewegung abgeschüttet. Für sämtliche Färbeschritte wurden die Zellen in 50 µl in Fluo-Puffer verdünntem Antikörper 20min auf Eis im Dunklen inkubiert. Danach wurden 150 µl Fluo-Puffer zugegeben und gut resuspendiert. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen bei 726 x g für 1 min zentrifugiert und konnten dann weiter prozessiert werden.

Im Fall einer Lebend-Tot-Färbung mit 7AAD wurden die Zellen nach Abschluss der Färbeschritte mit 50 µl 7AAD verdünnt in Fluo-Puffer für mindestens 15 min auf Eis im Dunklen inkubiert und vor der Analyse im Durchflusszytometer mit Fluo-Puffer verdünnt. Wenn die Lebend-Tot-Färbung mit dem Fixable Viability Dye eFluor 780 erfolgte, wurden die Zellen vor allen anderen Färbeschritten mit 100 µl dieses Farbstoffes verdünnt in Fluo-Puffer mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Fluo-Puffer zugegeben und die Zellen bei 726 x g für 1 min zentrifugiert.

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit dem Attune NxT Flow Cytometer. Dabei wurde zuerst eine Probe mit ungefärbten Leukozyten im FSC-SSC dargestellt. Falls nötig wurden anschließend Einzelfärbungen gemessen, um die Kompensation der verschiedenen Fluorochrome zu ermitteln. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FlowJo Software V10.

Antigen/Klon	Isotyp	Konjugat	Zielspezies	Ursprungsspezies	Konzentration	Hersteller
Bu1	IgG1	-	Huhn	Maus	0,625 µg/ml	SBA
KUL01	IgG1	-	Huhn	Maus	2,5 µg/ml	SBA
TCR1	IgG1	-	Huhn	Maus	0,625 µg/ml	SBA
TCR2	IgG1	-	Huhn	Maus	2,5 µg/ml	SBA
TCR3	IgG1	-	Huhn	Maus	2,5 µg/ml	SBA
Bu1	IgG1	Biotin	Huhn	Maus	2,5 µg/ml	SBA
Bu1	IgG1	AF647	Huhn	Maus	1,25 µg/ml	SBA
IgG (H+L)		APC	Maus	Ziege	0,625 µg/ml	SBA

Tabelle 9 Aufstellung der verwendeten Antikörper

Farbstoff	Name	Konzentration	Verwendung	Hersteller
eFluor 780	Fixable Viability Dye eFluor 780	1 µl/ml	Vor den Färbeschritten	eBioscience / Thermo Fisher Scientific
7AAD	7-Aminoactinomycin D	5 µg/ml	Nach den Färbungen	BioLegend

Tabelle 10 Verwendete Lebend-Tot-Farbstoffe

4.14. ELISA

4.14.1. Immunglobulin-Nachweis

Zum Nachweis von Immunglobulinen im Blutplasma wurde ein indirekter Sandwich-ELISA verwendet. Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wurden folgende Standards verwendet:

Immunglobulin	Standard	Verdünnung
IgY	Jackson ChromePure Chicken IgY ¹⁴	1,1 µg/ml log3
IgM	Rockland Chicken IgM ⁵	100 µg/ml log3
IgA	Kalibriertes Serum, Institut für Tierphysiologie, LMU München	0,15 µg/ml log3

Tabelle 11 Verwendete Standards zur Quantifizierung von Immunglobulin

Material:

Blutplasma frisch oder gelagert bei -20 °C

Beschichtungs- und Detektionsantikörper (siehe Tabelle 12)

Beschichtungspuffer pH 9,6, Lagerung 4 °C

3,11 g Na₂CO₃ ²

6,00 g NaHCO₃ ²

Ad 1 l Aqua dest.

TMB-Puffer pH 5,0, Lagerung 4 °C

4,90 g Na-Acetat ²

3,15 g Zitronensäure ²

Ad 1 l Aqua dest.

PBS-T

PBS (siehe 4.9.1)

0,05 % Tween 20 ²

Magermilchpulver ²

TMB-Stammlösung

6 mg Tetramethylbenzidin (TMB) ²

Ad 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) ²

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 % ²

1M Schwefelsäure ²

Maxisorp 96-Well Immunoplatte, Flachloch ²⁶

96-Well Platten Rundloch, unsteril ²¹

Adhäsive Folie ²¹

Papiertuch ⁹

Asys Atlantis Washer ³

FluoSTAR Omega Plate Reader

	IgY	IgM	IgA
Beschichtungs-Antikörper	Rabbit anti-chicken IgY (H+L) ¹⁴	Goat anti-chicken IgM ⁵	Mouse anti-chicken IgA ⁷
Detektions-Antikörper	Goat anti-chicken IgY-HRP ⁵ 0,05 µg/ml	Goat anti-chicken IgM-HRP ⁵ 0,05 µg/ml	Goat anti-chicken IgA-HRP ⁵ 0,1 µg/ml
Verdünnung von Blutplasma	1:1.000 log3	1:100 log3	1:100 log3

Tabelle 12 Antikörper für den Nachweis von Immunglobulin im ELISA

Durchführung:

Am Vortag erfolgte die Beschichtung der Immunosorp Platten mit 100 µl / Well des Beschichtungspuffers mit 2 ng/µl des Beschichtungsantikörpers und des Verschlusses der Platten mit einer Klebefolie. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C gelagert. Am Versuchstag wurden die beschichteten Platten mithilfe des Asys Atlantis Washers mit 3 x 400 µl PBS-T gewaschen. Zur Blockierung wurden danach 100 µl 4 % Magermilch, angerührt mit PBS, pro Well pipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Die Blockierlösung wurde anschließend mithilfe des Asys Atlantis Washers ausgewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte der Probenauftrag. Die Verdünnung des Blutplasmas ist Tabelle 12 zu entnehmen und erfolgte in 4 %

Magermilchlösung. Jede Probe wurde doppelt angesetzt und log3 verdünnt. Die Titration erfolgte auf unsterilen Rundlochplatten mit PBS-T. 50 µl jedes Wells wurden auf die Immunosorp Platten übertragen und 1 h bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Platten wie zuvor dreimal mit 400 µl PBS-T gewaschen. Der Detektionsantikörper wurde gemäß Tabelle 12 in 4 % Magermilchlösung verdünnt und pro Well wurden 50 µl zugegeben und wiederum 1 h bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurde der TMB-Puffer auf Raumtemperatur erwärmt. Nach der Inkubation des Detektionsantikörpers wurden die Platten gewaschen und über Kopf auf einem Papiertuch gelagert, bis alle Platten gewaschen waren. Kurz vor Verwendung wurde dann der TMB-Puffer mit der TMB-Stammlösung und H₂O₂ gemischt. Dabei wurden zu 10 ml TMB-Puffer 332 µl TMB-Stammlösung und 3 µl H₂O₂ gegeben. 100 µl dieser Lösung wurden dann zügig in jedes Well pipettiert und für exakt 10 min im Dunklen inkubiert. Nach Ablauf der 10 min wurden 50 µl 1M Schwefelsäure in jedes Well gegeben um die Farbreaktion zu stoppen. Wenn Peroxidase durch den Detektionsantikörper an das Antigen gebunden worden ist, löst diese die Aktivierung von TMB aus, das dadurch blau wird. Die Zugabe von Schwefelsäure stoppt diese Reaktion durch einen Farbumschlag zu gelb. Diese Gelbfärbung wurde anschließend mit dem Omega FluoSTAR photometrisch bei 450 nm gemessen. Zusätzlich erfolgte eine Messung bei 620 nm, um unspezifisches Hintergrundsignal zu identifizieren. Für die Auswertung wurde das Hintergrundsignal bei 620 nm vom Wert bei 450 nm subtrahiert und die Werte beider Dubletten dann gemittelt. Eine Blank-Korrektur erfolgte nicht. Die Darstellung dieser Daten erfolgte in einem Kurvendiagramm mit der OD (Optical Density – photometrisch gemessener Wert) auf der y-Achse und den Verdünnungsstufen auf der x-Achse.

Der mitgelaufene Standard wurde in einem zweiten Diagramm analysiert. Hierbei bilden die gemessenen OD-Werte die x-Achse und die zugehörige Konzentration die y-Achse. Im linearen Bereich dieser Kurve wurde eine Regressionsgerade eingefügt. Der Regressionskoeffizient war dabei $R^2 > 0,95$. Durch Umformung der Gleichung dieser Regressionsgeraden konnten nun die OD-Werte der Proben eingesetzt werden und mit der Verdünnungsstufe multipliziert werden. Diese errechneten Werte wurden in beiden Gruppen auf Mittelwert und Standardabweichung analysiert und im Balkendiagramm dargestellt.

4.14.2. Nachweis von anti-KLH Antikörpern

Der Nachweis von anti-KLH spezifischen Antikörper erfolgte mit einem indirekten ELISA. Die Platten wurden mit 10 µg/ml KLH ²³ beschichtet. Von den Tieren gebildete Antikörper gegen KLH binden so gegen das auf den Platten gebundene KLH. Über den Detektionsantikörper konnten des Weiteren Antikörper vom IgM und vom IgY Isotyp differenziert werden. Beide Detektionsantikörper sind Peroxidase gekoppelt und wurden wie in Tabelle 12 beschrieben verwendet. Die Durchführung der anti-KLH ELISAs erfolgte genauso wie beim Immunglobulin-Nachweis und ist unter 4.14.1 detailliert beschrieben.

4.15. Histologie

4.15.1. Anfertigung histologischer Schnitte

Material:

Aceton ²

PBS (siehe 4.9)

Aufsteigende Alkoholreihe

70 % Ethanol ²

99 % Ethanol ²

Isopropanol I ²

Isopropanol II ²

Xylol I ⁸

Xylol II ⁸

Pinsel

Eukitt mounting medium ²³

Superfrost Plus Objektträger ²⁶

Deckgläschen (18 x 18 mm) ²⁸

Feather C35 Kryotomklingen ²⁶

Kryotom (CryoStar NX70 ²⁶)

Durchführung:

Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Schnitte sind Gefrierschnitte. Die Präparation und Einbettung der Proben erfolgten wie unter 4.2.4.1 beschrieben. Die Schnittdicke betrug 8 µm. Vor der Färbung wurden die Schnitte zwei Minuten in

Aceton fixiert, zehn Minuten an der Luft getrocknet und anschließend 15 Minuten in PBS rehydriert. Im Anschluss an die Färbungen wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Reihenfolge war dabei 70 % Ethanol, 99 % Ethanol, zweimal Isopropanol und zweimal Xylol. Die Schnitte verblieben ca. 3 Minuten in jedem Bad, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Im Anschluss an das zweite Xylolbad wurden die Schnitte mit einem Deckgläschen und Eukitt mounting medium versiegelt.

4.15.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Material:

Eosin Färbelösung¹⁶

Mayer's Hämatoxylin Färbelösung¹⁶

Durchführung:

Nach Fixation und Rehydrierung wie unter 4.15.1 beschrieben, wurden die Schnitte 10 min in Mayer's Hämatoxylin Färbelösung gefärbt. Anschließend wurden sie kurz in Aqua dest. getaucht und für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden dann für 90 sek in Eosin gefärbt und für 2 min in Aqua dest. gewaschen. Nach diesen Färbeschritten wurden die Schnitte entwässert und eingedeckelt (siehe 4.15.1)

4.15.3. Immunhistologie

Material:

Methanol²

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 %²

PBS (siehe 4.9.1)

Bovines Serumalbumin²

Vectastain ABC-Kit⁷

Vector DAB = Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid³¹

Mayer's Hämatoxylin Färbelösung¹⁶

Inkubationskammer

Primäre Antikörper (siehe Tabelle 13)

Antikörper	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller
Maus anti-Huhn Bu1	IgG1	AV20	2,5 µg/ml	SBA
Maus anti-Huhn Desmin	IgG1	D9	100 µg/ml	Acris Antibodies

Tabelle 13 Verwendete Primärantikörper für die Immunhistologie

Durchführung:

Die Schnitte wurden wie unter 4.15.1 beschrieben fixiert und rehydriert. Um unspezifische Färbung durch endogene Peroxidasen zu verhindern, wurden die Schnitte danach mit Wasserstoffperoxid 1:100 in 40 %igem Methanol verdünnt 30 min im Dunklen inkubiert und anschließend 3 x 5 min in PBS gewaschen. Darauf folgte 1 h Inkubation mit dem Serum der Tierart, aus der der zweite Antikörper stammt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Dies ist bei Verwendung des Vectastain ABC Kits Pferdeserum. Dafür wurde das Serum 1:40 in PBS mit 1 % BSA verdünnt. Die Blockierlösung wurde anschließend abgekippt und der primäre Antikörper in PBS verdünnt aufpipettiert. Die Inkubation erfolgte entweder 1 h bei RT in der feuchten Kammer oder über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte in PBS für je 5 min. Für die Markierung des Antikörpers mit Peroxidase über eine Biotinylierung, sowie eine Biotin-Avidin-Bindung, wurde das Vectastain ABC Kit gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Detektion der Peroxidase erfolgte mit dem Vector DAB Kit und einem Abstoppen der Reaktion für 5 min unter Leitungswasser. Danach erfolgte eine Kernfärbung mit Mayer's Hämatoxylin. Die Schnitte wurden dazu 40 sek in die Färbelösung getaucht, in Aqua dest. geschwenkt und anschließend 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut sowie weitere 5 min in Leitungswasser belassen. Danach erfolgte die Entwässerung und das Eindeckeln der Schritte wie bereits unter 4.15.1 beschrieben.

4.16. Prozessierung der Next-Generation-Sequencing Daten

Die Vorbereitung der Proben erfolgte wie unter 4.6.3 beschrieben. Bei der Sequenzierung durch die Firma Novogene (UK) Company Ltd. wurden an die Primer individuelle Barcodes angehängt, wohingegen für die Sequenzierung mit Eurofins Genomics Germany GmbH nur universelle Adapter verwendet worden sind, da die Firma im Rahmen des NGSelect Amplicon 2nd PCR Programms die individuelle Kennzeichnung durchführte (siehe 4.6.3). Um die NGS-Daten analysieren zu können, wird durch die Core Facility Bioinformatik/den Lehrstuhl für Bioinformatik eine Pipeline generiert. Da die Pipeline zum momentanen Zeitpunkt nicht voll funktionsfähig ist, wird in dieser Arbeit nur die Qualitätskontrolle der sequenzierten Proben durch FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) gezeigt. Dieses frei verfügbare Programm des Babraham-Instituts analysiert Hochdurchsatz-Sequenzierungs-Daten auf die Qualität der einzelnen Basen, die Qualität der Sequenzen, den Basengehalt, die durchschnittliche Länge des sequenzierten Fragments und Duplikationen.

4.17. Statistische Auswertung

Die Sammlung der Daten erfolgte in Excel 2010. Hier wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Zur statistischen Analyse wurde SPSS verwendet. Das Vorliegen der Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk Test überprüft. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurde die Signifikanz zu einem Niveau von $p \leq 0,05$ mit dem t-Test errechnet. Bei nicht normalverteilten Daten folgte der Mann-Whitney-U Test für unabhängige Proben ($p \leq 0,05$).

Outlier wurden ab dem 3.IQR identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen.

Die Darstellung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism Version 8. Das Vorliegen eines signifikanten Unterschieds ($p \leq 0,05$) wurde mit einem ‚*‘ gekennzeichnet.

5. ERGEBNISSE

5.1. Generierung von $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ Tieren

Ein wichtiger Schritt in der Entwicklung des Immunsystems des Huhns ist die Einwanderung der B-Zellen in die Bursa während der embryonalen Phase. Als ein zentraler auslösender Faktor für diese Migration wurde das Rearrangement von schwerer und leichter Kette im Zuge der Bildung des BCR vermutet (siehe 2.1.2). Schusser et al. zeigten, dass weder ein Knockout des J-Segments der schweren Kette der Immunglobuline noch ein Knockout der leichten Kette diese Migration der B-Zellen in die Bursa inhibieren [1, 2]. Um darzulegen, dass nicht das Rearrangement des jeweils verbleibenden Segments die Einwanderung auslöst, wurden in dieser Arbeit beide Knockouts kombiniert und das Rearrangement so gänzlich inhibiert.

5.1.1. Anpaarungsstrategie

Um ein Tier mit komplettem Immunglobulin Knockout zu generieren, wurden zwei Knockout-Linien kombiniert. Das zugrundeliegende Anpaarungsschema folgt Mendels Unabhängigkeitsregel. Hierbei werden zwei Merkmale betrachtet, die unabhängig voneinander vererbt werden. Zur Generierung der Doppel-Knockout Tiere wurden Tiere mit homozygotem Knockout der schweren Kette der Immunglobuline ($JH^{-/-}$) mit homozygoten Tieren des Knockouts der leichten Kette der Immunglobuline ($IgL^{-/-}$) angepaart. Die daraus resultierende F_1 -Generation ist heterozygot für beide Merkmale ($JH^{+/-}$ $IgL^{+/-}$). Ein entsprechendes Anpaarungsschema ist in Abb. 9 dargestellt.

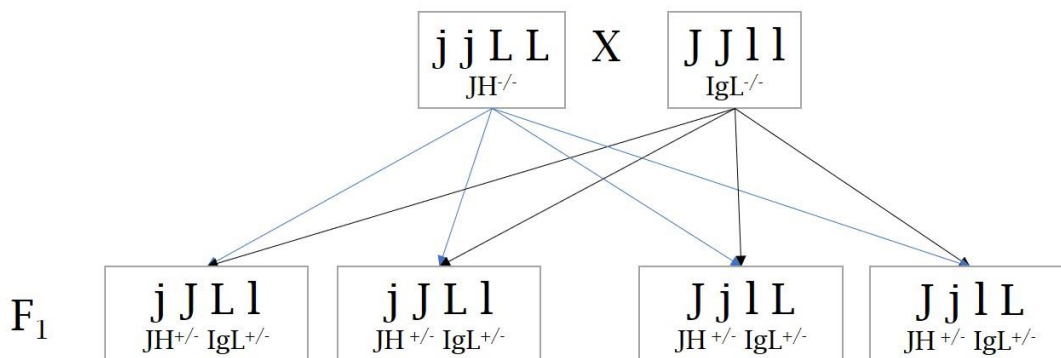


Abb. 9 Anpaarungsschema der partiellen Knockouts $JH^{-/-}$ und $IgL^{-/-}$

In einem dihybriden Erbgang ist der Genotyp der F_1 -Generation - nach Anpaarung der für ihr Merkmal homozygoten Eltern - immer heterozygot für beide Merkmale.

Nach Erreichen der Geschlechtsreife dieser doppelt heterozygoten Tiere wurden männliche und weibliche Tiere untereinander verpaart. Da jedes Elternteil ein Allel für jedes Merkmal vererbt, treten in der F₂-Generation verschiedene neue Kombinationen auf. Darunter gibt es auch Tiere, die homozygote Anlagen für beide Knockouts tragen und somit ein komplettes Knockout von JH und IgL haben. Das Schema dieses Erbgangs ist in Abb. 10 dargestellt. Insgesamt treten sieben verschiedene Genotypen auf. Ein Tier aus 16 hat dabei den Genotyp JH^{-/-} IgL^{-/-}. Die anderen Tiere sind WT, heterozygot oder homozygot für eines oder beide Merkmale.



Abb. 10 Auftreten verschiedener Genotypen durch Kreuzung der F₁-Generation

Kreuzt man die F₁-Generation miteinander, entstehen neue Genotypen mit unterschiedlichen Kombinationen der Allele. Ein Tier aus 16 Nachkommen hat dabei den Genotyp JH^{-/-} IgL^{-/-}. Die anderen Nachkommen sind entweder WT, heterozygot oder homozygot für eines oder beide Allele. Großbuchstaben kodieren WT Allele, Kleinbuchstaben bedeuten ein genetisch modifiziertes Allel. Der Erbgang mit zwei Merkmalen folgt Mendels Unabhängigkeitsregel.

5.1.2. Genotypisierung der JH^{-/-} IgL^{-/-} Tiere

Zur Identifizierung eines JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieres wurde aus inkubierten Eiern der F₂-Generation an ET10 Blut entnommen (siehe 4.2.1) und auf Basis der gDNA die Genotypisierungs-PCR wie unter 4.6.1 beschrieben durchgeführt. Abb. 11 zeigt beispielhaft die Auswertung der Genotypisierung durch eine Gelelektrophorese.

Hier kann Tier 1 als $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ – doppelt homozygot – identifiziert werden, da dieses Tier in der JH-KO und in der IgL-KO PCR ein Amplikon spezifisch für den JH-KO, bzw. den IgL-KO aufweist und gleichzeitig die Banden bei der JH-WT und IgL-WT PCR fehlen. Tier 7 zeigt bei allen PCRs eine Bande der entsprechenden Größe und ist damit ein $JH^{+/+}$ $IgL^{+/+}$ doppelt heterozygotes Tier. Auch Tiere, die nur homozygot für das JH-Knockout (Tier 10) bzw homozygot für das IgL-Knockout (Tier 6) sind, kommen vor.

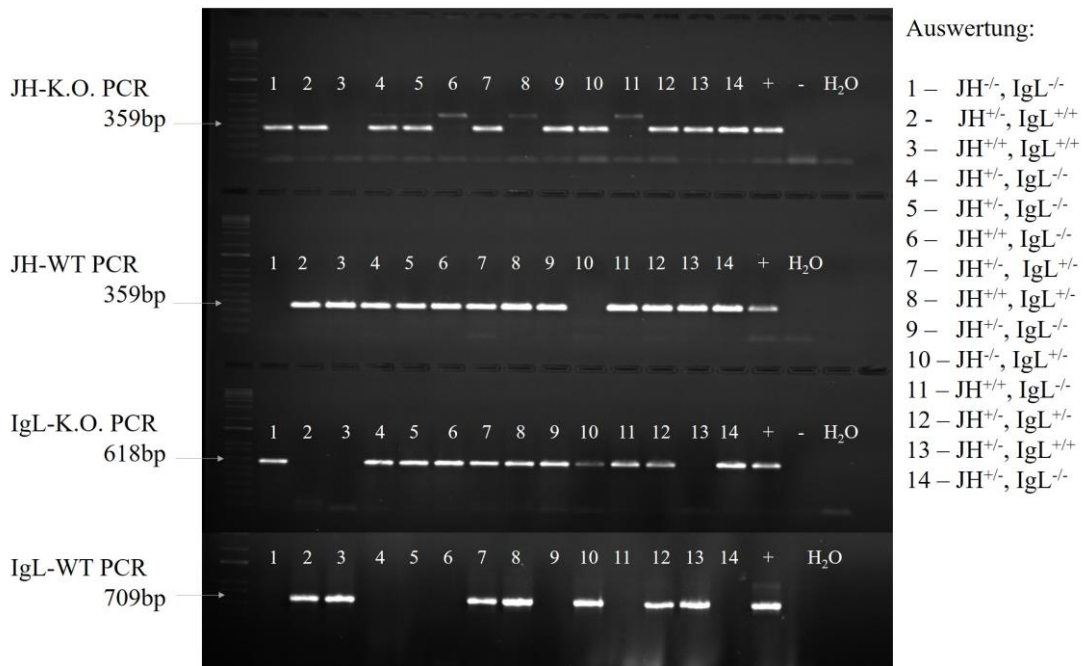


Abb. 11 Gelelektrophorese der Genotypisierungs-PCRs verschiedener Tiere

Zur Identifizierung von doppelt homozygoten $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ Tieren wurden die unter 4.6.1 beschriebenen PCRs mit einer anschließenden Gelelektrophorese durchgeführt. $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ Tiere zeigen Banden bei der JH-KO, sowie bei der IgL-KO PCR, aber keine Banden bei den WT PCRs.

5.1.3. Durchflusszytometrie der $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ Tiere

Um den Phänotyp der $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ Tiere zu bestätigen, wurde das Blut dieser Tiere im Alter von zwei Wochen auf B-Zellen analysiert. Es wurde von drei Tieren pro Genotyp Blut entnommen und die PBMCs mit einem direkt konjugierten B-Zell spezifischen Antikörper (Bu1-AlexaFluor647) gefärbt. Zusätzlich wurde mit 7AAD zwischen lebenden und toten Zellen differenziert (siehe 4.13). WT Tiere haben bei 50.000 analysierten lebenden Zellen einen Prozentsatz von 0,84% Bu1 positiven Zellen, wohingegen weder in $JH^{-/-}$, noch in $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ Tieren Bu1 positive Zellen nachgewiesen werden konnten.

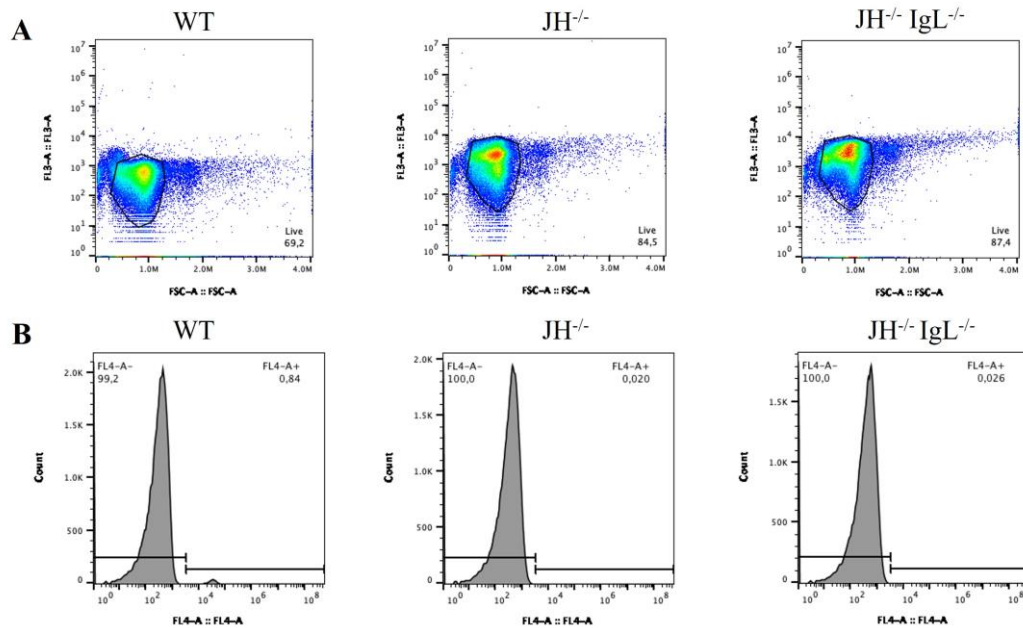


Abb. 12 Durchflusszytometrie von PBMCs vergleichend von WT, JH^{-/-} und JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren an Tag 14

Die Färbung von PBMCs mit einem B-Zell spezifischen Antikörper (Bu1-AF647). Zuvor wurde mit 7AAD zwischen lebenden und toten Zellen distiguiert (A). Im darauffolgenden Histogramm (B) wurden die lebenden Zellen auf die Färbung mit Bu1 analysiert. WT Tiere zeigen hier 0,84% Bu1 positive Zellen, wohingegen weder JH^{-/-}, noch JH^{-/-} IgL^{-/-} Tiere Bu1 positive Zellen im Blut haben. Es wurde exemplarisch ein Tier dargestellt von drei untersuchten je Genotyp.

Mit diesem Versuch wurde gezeigt, dass die B-Zellen in JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren nicht aus der Bursa auswandern können. Dies wurde bereits von Schusser et al. für JH^{-/-} Tiere gezeigt und hier nochmals bestätigt (siehe 2.2.3) [1].

5.1.4. Histologie der Bursa

Nach der erfolgreichen Generation und Typisierung der JH^{-/-} IgL^{-/-} Tiere wurden die genotypisierten Embryonen an ET18 euthanasiert und die Bursa entnommen. Die Immunhistologie dieser Bursen auf das Vorkommen von B-Zellen mit dem B-Zell spezifischen Marker (Bu1) sowie eine Hämatoxylin-Eosin Färbung ist in Abb. 13 vergleichend zwischen JH^{-/-} IgL^{-/-}, JH^{-/-} und WT Tieren dargestellt.

Im WT sieht man in beiden Färbungen dicht gedrängt Follikel. Die Bu1 Färbung bestätigt, dass diese Follikel B-Zellen enthalten. Zwischen den Follikeln erkennt man Leerräume, die die einzelnen Plicae voneinander abgrenzen. In Bursen von WT Tieren sind die B-Zellfollikel dicht gedrängt und gefüllt mit B-Zellen, während

in den Schnitten der $JH^{-/-}$ Tiere nur noch wenige Follikel zu sehen sind. Diese Follikel sind kleiner als im WT und haben weniger Bu1 spezifisches Signal. Die Follikel liegen in $JH^{-/-}$ Tieren am Rand der Falten und sind unregelmäßiger geformt. In den Schnitten der $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ Tiere stellen sich beider Färbungen ähnlich wie in $JH^{-/-}$ Tieren dar: Es sind noch B-Zellfollikel erkennbar, aber diese sind sehr spärlich über die ganze Bursa verteilt. Somit wandern trotz Inhibition des Rearrangements beider Immunglobulinketten noch B-Zellen in die Bursa ein.

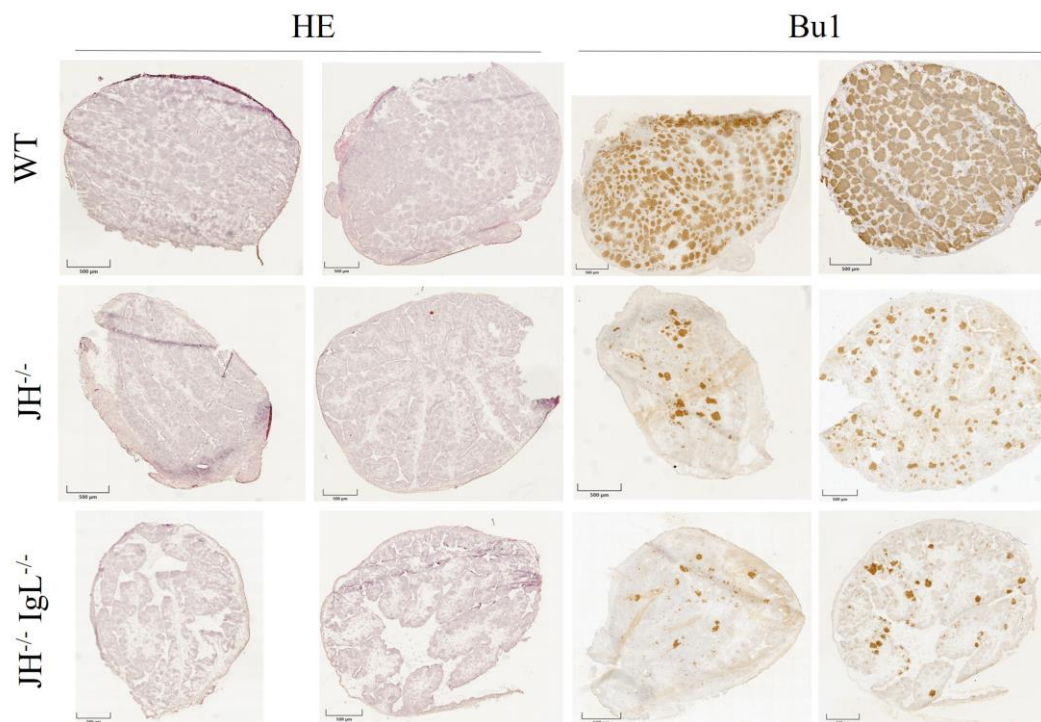


Abb. 13 Histologie der Bursa an ET18 vergleichend WT, $JH^{-/-}$ und $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ Tiere, 2,5fache Vergrößerung

Gefrierschnitte wurden HE gefärbt sowie im Rahmen einer Immunhistologie mit einem B-Zell spezifischen Antikörper (Bu1) inkubiert und mit DAB entwickelt. Pro Genotyp sind exemplarisch zwei Tiere von mindestens drei untersuchten dargestellt. In allen Genotypen sieht man eine Differenzierung des Gewebes in Follikel, die B-Zellen enthalten. Im WT liegen die Follikel dicht zusammen, wohingegen Schnitte von $JH^{-/-}$ Tieren wenig Follikel aufweisen. In Schnitten von $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ Tieren sind ebenso vereinzelt B-Zellen und Follikel erkennbar.

Um dies noch zu einem anderen Zeitpunkt zu untersuchen und die weitere Entwicklung der Follikel zu beobachten, wurden im Folgenden histologische Gefrierschnitte der Bursa sieben Tage alter Küken angefertigt. Zusätzlich wurde hier eine Immunhistologie mit einem kreuzreaktiven anti-human-Desmin-Antikörper verwendet, um weitere mögliche Veränderungen darstellen zu können (Abb. 14).

Verglichen mit ED18 (siehe Abb. 13) ist die Proliferation der Bursa mit Follikeln an Tag 7 bei allen Genotypen deutlich fortgeschritten.

Die Bursen von WT Tieren zeigen an Tag 7 eine sehr dichte Besiedelung mit B-Zellfollikeln. Die Follikel liegen so dicht gedrängt, dass einzelne Follikel kaum abzugrenzen sind. In Bursen von $JH^{-/-}$ Tieren sind die Plicae auch mit Follikeln besetzt, doch zwischen den einzelnen Follikeln ist freier Raum erkennbar und in der Mitte der Follikel sind teilweise keine B-Zellen vorhanden. Wie schon an ET18 setzt sich diese Beobachtung in Schnitten von $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ Tieren fort: Es gibt noch vereinzelt B-Zellfollikel in der Bursa, aber insgesamt deutlich weniger als im WT. Zudem sind die vorhandenen Follikel kleiner und mit weniger B-Zellen gefüllt. Dennoch sind in den Schnitten von $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ Tieren immer noch eindeutig B-Zellen nachweisbar.

In der Desmin-Färbung erkennt man im WT die beginnende Ausbildung der Basalmembran, die mit fortschreitender Entwicklung die Grenze zwischen Mark und Rinde des Follikels bildet. In $JH^{-/-}$ Tieren fehlt die Separierung von Rinde und Mark, so kann man auch bei den hier angefertigten Schnitten kein positives Desmin-Signal in den äußeren Reihen des Follikels sehen. Stattdessen umgibt das Desmin-Signal weiterhin den Follikel. Konsekutiv folgend zeigen auch $JH^{-/-}$ $IgL^{-/-}$ Tiere zu diesem Zeitpunkt keine Anzeichen einer beginnenden Separierung.

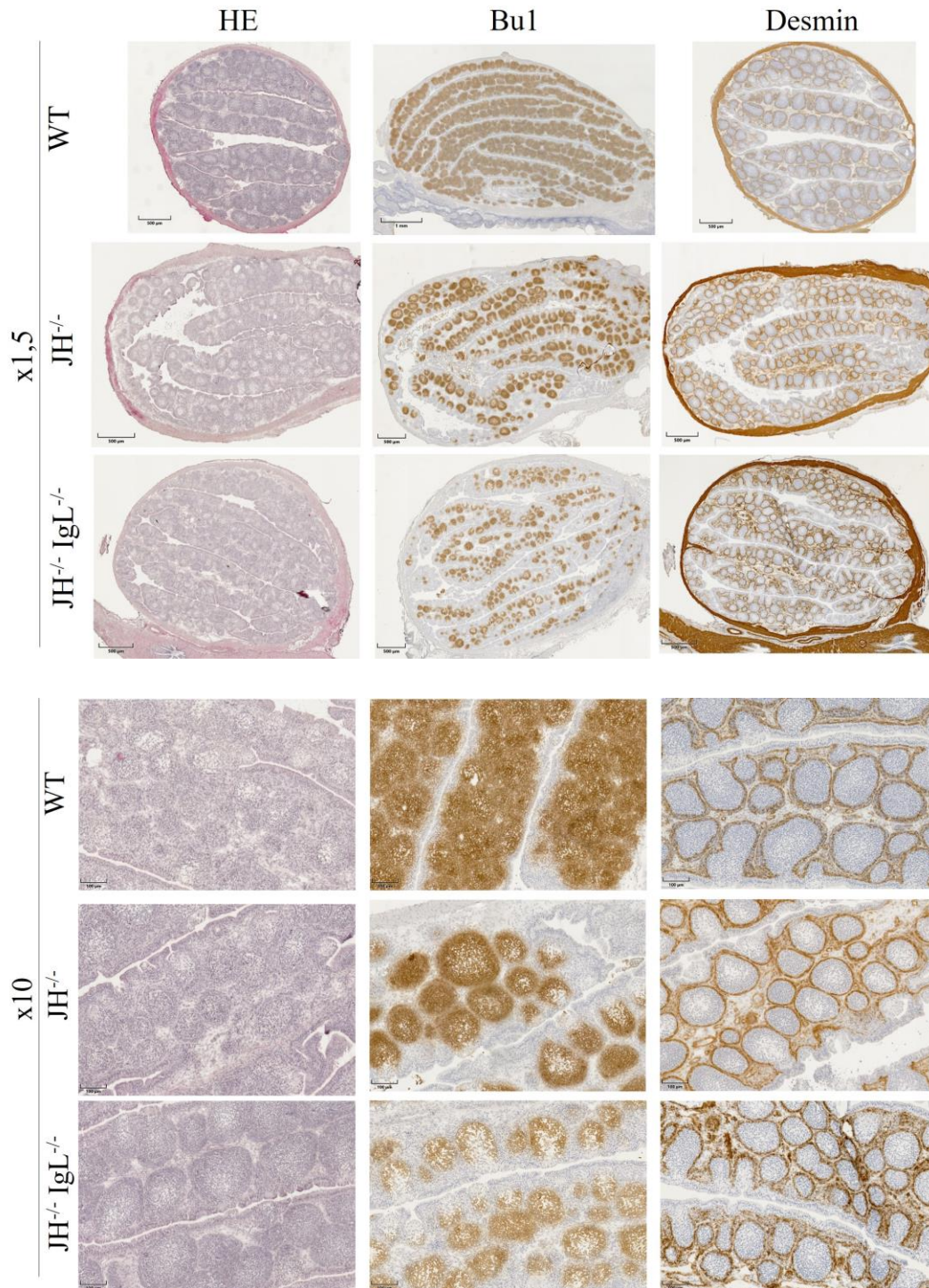


Abb. 14 Histologie der Bursa an Tag 7 vergleichend WT, JH^{-/-} und JH^{-/-} IgL^{-/-}, verschiedene Vergrößerungen

Gegenüberstellung einer HE Färbung und immunhistologischen Färbungen mit einem B-Zell spezifischen Antikörper (Bu1), sowie einem kreuzreaktiven anti-Desmin Antikörper. Je Genotyp und Färbung wurde aus drei untersuchten Tieren exemplarisch ein repräsentatives Bild ausgewählt. Schnitte von WT Tieren zeigen Follikel gefüllt mit B-Zellen in der gesamten Bursa, sowie die beginnende Ausbildung einer Basalmembran. In Bursen von JH^{-/-} Tieren und noch deutlicher in JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren stellen sich die Follikel kleiner und spärlicher besiedelt dar. In JH^{-/-} und JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren zeigt sich zudem keine Separierung der Follikel in Rinde und Mark.

5.1.5. Etablierung des B-Zell Sorts für RNA Sequenzierungsanalysen

Die bisherigen Versuche legen dar, dass das Rearrangement der beiden Immunglobulinketten nicht alleine ausschlaggebend für die Migration der B-Zellen in die Bursa sein kann. Um auslösende Faktoren für die Migration zu finden, sollten mittels RNA Sequencing Zellen vor und nach der Einwanderung in die Bursa verglichen werden. Dies setzt voraus, dass B-Zellen aus Blut, Bursa und Milz in hoher Reinheit vorliegen. Da der Prozentsatz von B-Zellen an ET12 im niedrigen einstelligen Bereich liegt, wurden die Zellen mittels eines Sorts angereichert. Als erfolgreichste Methode hat sich dabei der magnetische Sort der Firma Miltenyi herausgestellt (siehe 4.12). Hierbei hat sich die Verwendung von großen Poolgrößen gegenüber weniger Organen als effizienter herausgestellt. Auch die Verwendung von Labelling-Puffer ohne BSA und die Gerinnungshemmung durch Heparin statt EDTA hatten einen positiven Einfluss auf den Erfolg des Experiments. Andere Sort Methoden wie z.B. die Verwendung eines FACS-Sorters oder die Verwendung von Dynabeads führten leider nicht im gewünschten Maße zur Anreicherung der Zellen.

In Abb. 15 sieht man die Leukozyten aus Blut, Bursa und Milz vor und nach Anreicherung über zwei magnetische Säulen des MACS Systems. Eine Lebend-Tot Färbung ermöglicht dabei eine genauere Differenzierung (Abb. 15A). An ET12 sind ohne Anreicherung im Blut 0,4%, in der Bursa 2,5% und in der Milz 4,3% Bu1 positive Zellen nachweisbar (Abb. 15B). Nach der Aufreinigung sind es aus dem Blut 97,8%, aus der Bursa 74,2% und aus der Milz 67,0% Bu1 positive Zellen (Abb. 15C).

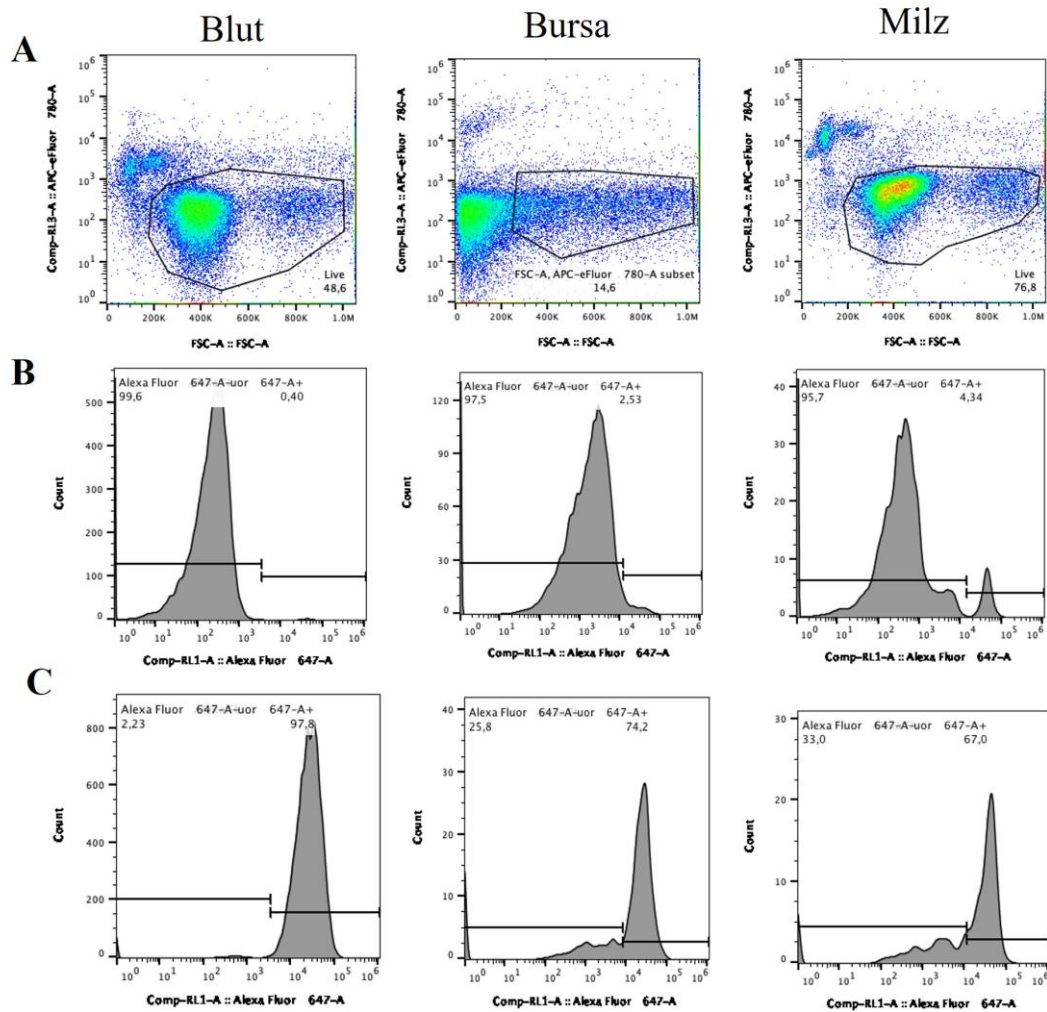


Abb. 15 Ergebnisse des magnetischen Sorts der B-Zellen aus embryonalen Organen

Leukozyten wurden aus verschiedenen Organen an ET12 isoliert und mit Streptavidin-Beads des MACS Systems über zwei magnetische Säulen aufgereinigt. A – das Gating der Zellen erfolgt anhand einer Lebend-Tot Färbung mit Fixable Viability Dye eFluor 780 B – Kontrollfärbungen auf B-Zellen auf Leukozyten, isoliert aus dem jeweiligen Gewebe C – Darstellung der lebenden, gesorteten Zellen nach erneuter Anfärbung über das Bu1 Epitop mit AF647.

Im weiteren Verlauf sollen von diesen drei Organen jeweils drei unabhängige Proben gewonnen werden und die extrahierte RNA zum Sequenzieren geschickt werden. Diese Versuche sind nicht mehr Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

5.2. Analyse des Fehlens von maternalen Antikörpern auf die Entwicklung von Küken

Mit der Elimination des J-Segments der schweren Kette wird in homozygoten Tieren die Ausbildung von funktionalen Antikörpern inhibiert (siehe 2.2.3). Werden solche Tiere als Elterntiere verwendet, hat der Nachwuchs keine maternalen Antikörper. Im Folgenden werden so generierte Tiere ohne maternale Antikörper gegen eine Kontrollgruppe mit maternalen Antikörpern verglichen und auf verschiedene Parameter analysiert.

5.2.1. Einteilung der Versuchsgruppen

Für die Versuchsgruppe ohne maternale Antikörper wurden $JH^{-/-}$ Hennen mit WT Hähnen angepaart, für die Kontrollgruppe mit maternalen Antikörpern wurden WT Hennen mit $JH^{-/-}$ Hähnen angepaart. Der Genotyp des Nachwuchses dieser beiden Anpaarungen wird immer $JH^{+/-}$ sein. Damit die exakt gleichen genetischen Bedingungen geschaffen sind, stammen alle $JH^{-/-}$ und WT Elterntiere aus der gleichen $JH^{+/-} \times JH^{+/-}$ Anpaarung. Das Anpaarungsschema für die Versuchs- und Kontrollgruppe ist in Tabelle 14 dargestellt.

Gruppe	Abkürzung	Maternaler Genotyp	Paternaler Genotyp	Genotyp der Versuchstiere
Versuchsgruppe	mat. neg.	$JH^{-/-}$	WT	$JH^{+/-}$
Kontrollgruppe	mat. pos.	WT	$JH^{-/-}$	$JH^{+/-}$

Tabelle 14 Anpaarungsschema zur Generierung von Tieren ohne maternale Antikörper

Versuchs- und Kontrollgruppe wurden im selben Raum unter gleichen Haltungsbedingungen gehalten (siehe 4.1). Sie erhielten dieselben Untersuchungen und Probenentnahmen zum gleichen Zeitpunkt. Diese Zeitpunkte sind in Tabelle 15 zu sehen. In einem wöchentlichen Rhythmus erfolgten das Wiegen der Tiere und eine Blutentnahme. An Tag 35 und Tag 56 wurde KLH *intramuskulär* appliziert (siehe 4.2.3).

Lebenstag	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70
Wiegen	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Blutentnahme	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
KLH Injektion						X			X		

Tabelle 15 Untersuchungs- und Probennahmerhythmus der Versuchstiere

5.2.2. Bestätigung des Phänotyps der Elterntiere

5.2.2.1. Fehlen von Antikörpern bei $JH^{-/-}$ Tieren

Die Identifizierung homozygoter $JH^{-/-}$ Elterntiere erfolgte wie unter 4.6.1 beschrieben mit Hilfe der Genotypisierungs-PCRs und einer anschließenden Gelelektrophorese. Um eventuelle Fehler in der Genotypisierung auszuschließen und das Fehlen von Antikörpern zu bestätigen, wurde das Blutplasma auf das Vorhandensein von IgY, IgM und IgA Antikörpern untersucht. Das Plasma eines WT Tieres diente dabei als Positivkontrolle. Der Mittelwert aller homozygoten $JH^{-/-}$ Tiere für jeden Immunglobulin-Isotyp ist in Abb. 16 dargestellt.

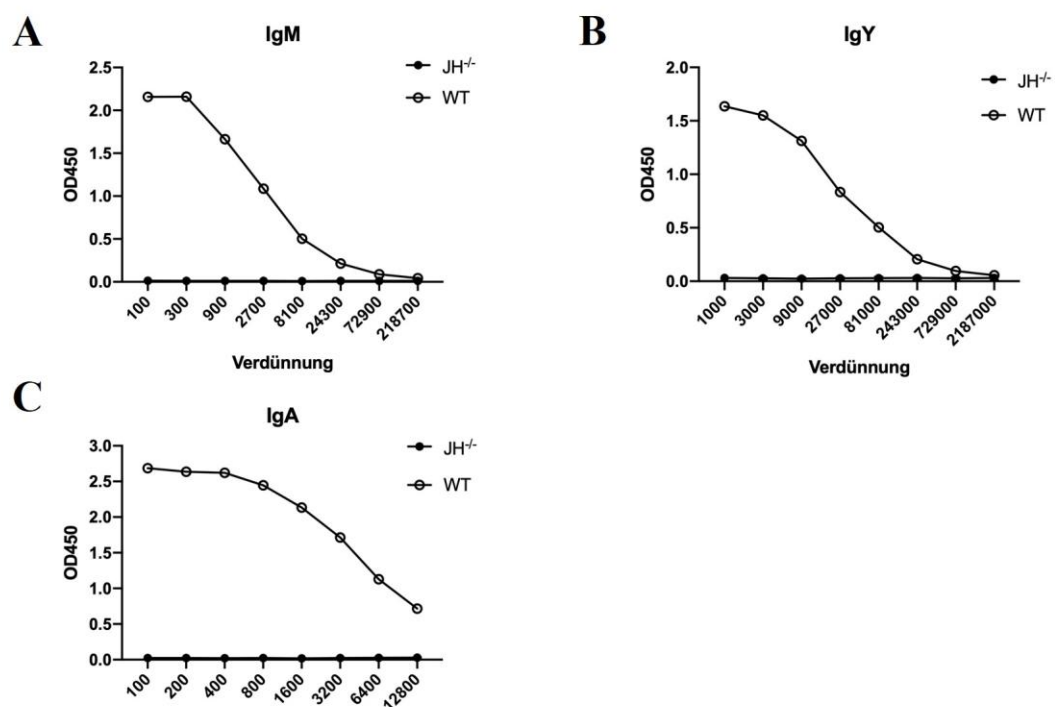


Abb. 16 Fehlen von Antikörpern im Blut der parentalen $JH^{-/-}$ Tiere

Vollständiges Fehlen von IgY, IgM und IgA Antikörpern im Blut der parentalen $JH^{-/-}$ Tiere. Als Positivkontrolle wurde ein WT Tier aus dem gleichen Versuch verwendet. A – IgM spezifischer ELISA, Blutplasma 1:100 log3 verdünnt. B – Nachweis von IgY mittels ELISA Blutplasma 1:1000 log3 verdünnt. C - IgA spezifischer ELISA, Blutplasma 1:100 log3 verdünnt. Dargestellt wird der Mittelwert aller $JH^{-/-}$ Tiere mit n=13

5.2.2.2. Fehlen von IgY im Dotter von weiblichen JH^{-/-} Hennen

Wie unter 2.3.3 beschrieben, werden maternale IgY Antikörper im Dotter gespeichert und stehen so dem Küken zum Zeitpunkt des Schlupfes zur Verfügung. Da JH^{-/-} Hennen keine funktionalen Antikörper haben, sind diese Hennen nicht in der Lage, Antikörper an ihren Nachwuchs weiterzugeben. Dieses Fehlen von maternalen Antikörpern ist deutlich im Dotter der Eier dieser Hennen zu sehen. In Abb. 17 ist der IgY Gehalt im Dotter von Eiern der JH^{-/-} Hennen und der IgY Gehalt in Dottern von Eiern von WT Hennen gezeigt. Die Eier von WT Hennen haben im Mittel einen IgY Gehalt von 5,4 mg/ml, wohingegen in den Dottern von JH^{-/-} Hennen kein IgY nachweisbar ist.

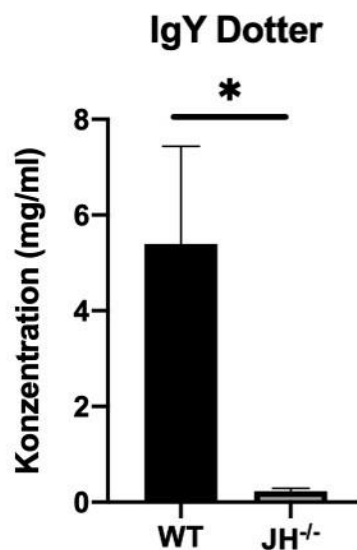


Abb. 17 IgY Gehalt im Dotter von JH^{-/-} und WT Hennen

WT Hennen übertragen maternale IgY Antikörper über den Dotter, JH^{-/-} Hennen übertragen keine IgY Antikörper im Dotter. n=3 Normalverteilung getestet mit Shapiro-Wilk, anschließender t-Test mit p≤0,05.

5.2.3. Anpassung der Versuchsgruppen

5.2.3.1. Genotypisierung aller Tiere im Versuch

Da, wie in Tabelle 14 gezeigt, beide Anpaarungen für die Versuchs- und die Kontrollgruppe JH^{-/-} x WT sind, müssen alle Nachkommen einen JH^{+/-} Genotyp haben. Dies wurde mit den unter 4.6.1 beschriebenen Genotypisierungs-PCRs und einer anschließenden Gelelektrophorese nachgewiesen. In Abb. 18 sieht man beispielhaft an 28 Tieren, dass alle Versuchstiere sowohl eine Bande bei 382 bp in der JH-KO PCR als auch bei 359 bp in der JH-WT PCR haben. Demzufolge sind

alle Tiere heterozygot für den Knockout des JH Segments.

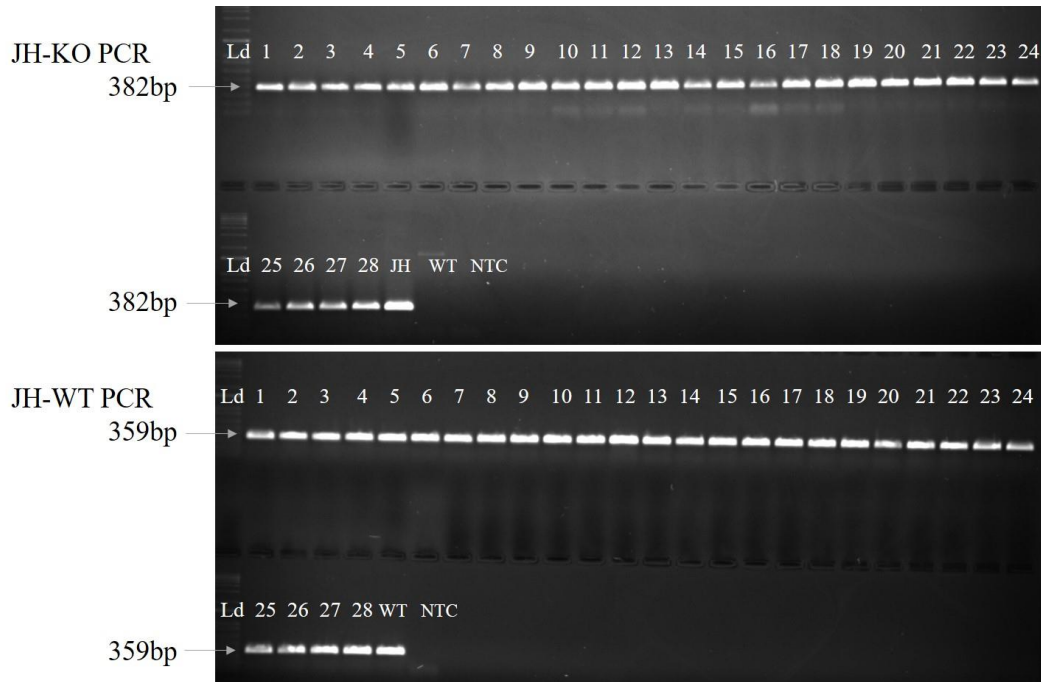


Abb. 18 Beispielhaftes Genotyping von Versuchs- und Kontrollgruppe

Da beide parentalen Anpaarungen für die Versuchs- und Kontrollgruppe $JH^{-/-}$ x WT ist, sind alle Nachkommen $JH^{+/-}$ veranlagt und weisen somit sowohl eine Bande bei 382 bp in der JH-KO PCR, als auch eine Bande bei 359 bp in der JH-WT PCR auf. Hier sind beispielhaft 28 Tiere aus beiden Gruppen dargestellt.

5.2.3.2. Sexing der Tiere

Um die Kontrollgruppe der Versuchsgruppe nicht nur in gleicher Anzahl, sondern auch in gleicher Geschlechtsverteilung anpassen zu können, wurden das Geschlecht per PCR bestimmt (siehe 4.6.2). Dabei werden W- und Z-Chromosom in einer Multiplex-PCR amplifiziert. Weibliche Tiere mit dem Genotyp WZ erhalten bei der W-PCR eine Bande bei 375 bp und bei der Z-PCR eine Bande bei 250 bp, männliche Tiere, die nur das Z-Chromosom haben, zeigen nur eine Bande in der Z-PCR. In Abb. 19 sind die schon unter 5.2.3.1 gezeigten 28 Tiere dargestellt, von denen 18 weiblich und 10 männlich sind.

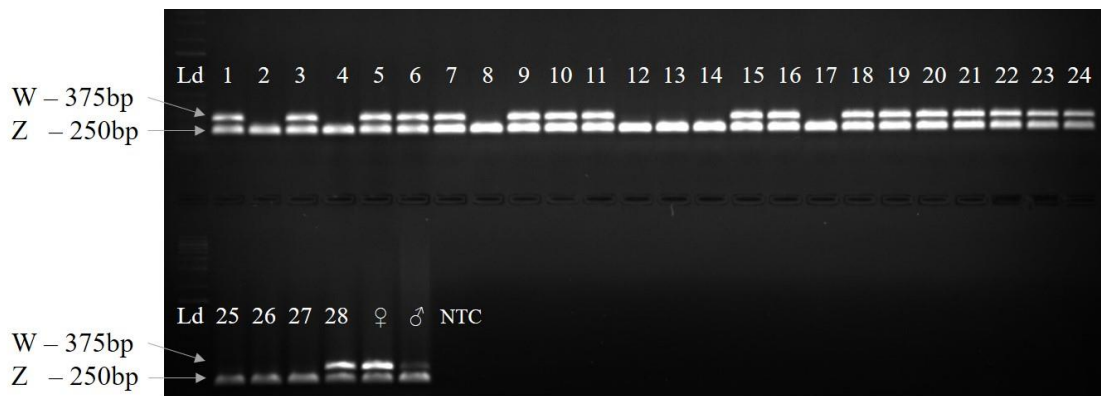


Abb. 19 Sexing der Versuchstiere, um die Geschlechterverteilung der Kontrollgruppe an die Versuchsgruppe anzupassen

Multiplex-PCR auf das Vorliegen von W- und Z-Chromosom im Genom jedes Tieres. Weibliche Tiere (WZ) zeigen sowohl eine Bande bei 375 bp, als auch bei 250 bp. Männliche Tiere (Z) zeigen nur eine Bande bei 250 bp. Dargestellt sind 28 repräsentative Tiere.

5.2.4. Verringerte Gewichtszunahme der Versuchsgruppe

Wie unter 5.2.1 beschrieben, wurden die Versuchstiere wöchentlich bis zu einem Alter von 10 Wochen gewogen. Um eine genauere Aufschlüsselung zu erhalten, wurden bei der Auswertung der Daten immer zuerst alle Tiere untersucht und dann zusätzlich nach Geschlecht getrennt gruppiert.

5.2.4.1. Gewicht der Versuchstiere

Abb. 20A zeigt den Mittelwert der absoluten Gewichte aller Tieren des Versuchs. In Abb. 20B sind die weiblichen, in Abb. 20C die männlichen Tiere dargestellt. Die Normalverteilung wurde mit dem Test nach Shapiro-Wilk untersucht und bei Vorliegen einer Normalverteilung mit einem t-Test ($p \leq 0,05$) fortgesetzt. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-U Test angewandt ($p \leq 0,05$).

In Abb. 20A zeigt sich, dass die Versuchsgruppe wöchentlich mit signifikantem Unterschied leichter ist als die Kontrollgruppe. Bei den weiblichen Tieren (Abb. 20B) ist diese signifikante Reduktion des Gewichts außer an Tag 35 ebenfalls gegeben. Ebenso verhält es sich bei den männlichen Tieren (Abb. 20C), wobei hier die Signifikanz nur an Tag 14, 21, 28, 35, 42, 63 und 70 gegeben ist.

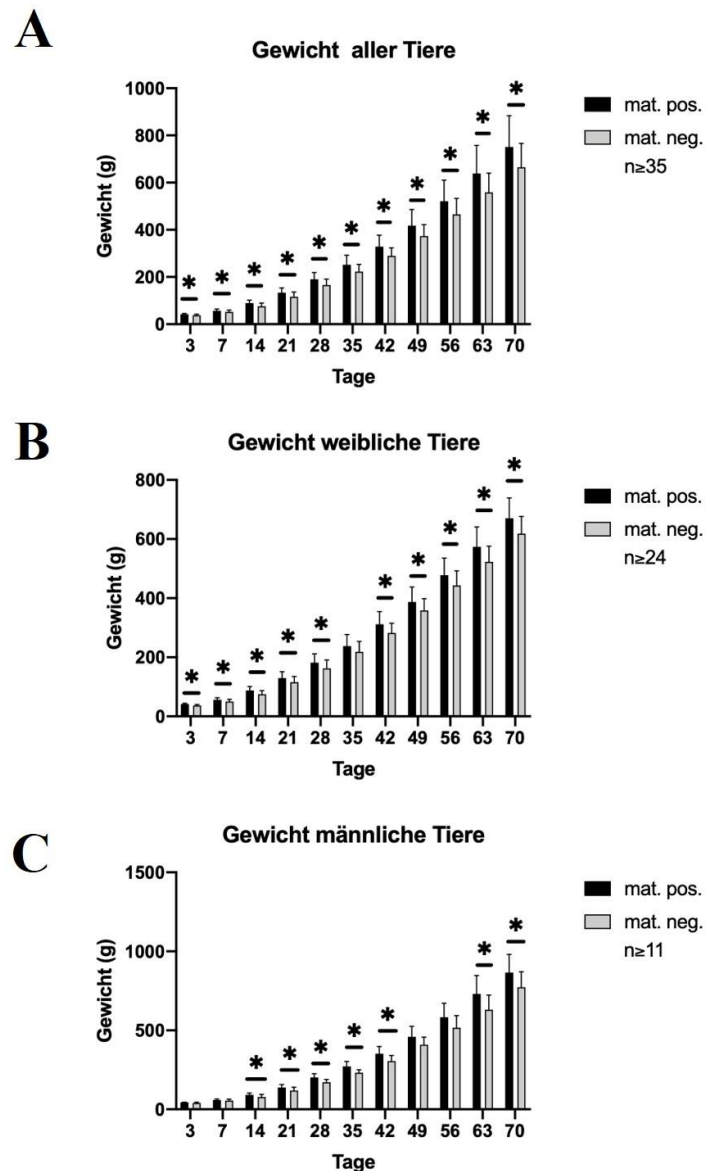


Abb. 20 Gewichte der Versuchsgruppe im wöchentlichen Rhythmus

Absolute Gewichte der Tiere über den Versuchszeitraum. A – Betrachtet alle Tiere im Versuch. Signifikante Gewichtsreduktion der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe an allen Messtagen. B - Nur weibliche Tiere werden betrachtet. Höhere Gewichte der Kontrollgruppe mit zumeist signifikantem Unterschied. C – Nur männliche Tiere. Versuchsgruppe zeigt niedrigere Gewichte über die Zeit mit teilweise signifikantem Unterschied. A-C: Dargestellt sind die Mittelwerte jeder Gruppe mit zugehöriger Standardabweichung. Die Normalverteilung wurde getestet nach Shapiro-Wilk. Normalverteilte Daten wurden mit einem t-Test ($p \leq 0,05$) auf das Vorliegen einer Signifikanz getestet, nicht normalverteilte Daten mit einem Mann-Whitney-U Test ($p \leq 0,05$).

5.2.4.2. Zunahmen der Tiere

Durch Subtraktion des Gewichts der vorhergehenden Messung vom aktuellen Gewicht wurde die Zunahme der Tiere pro Woche ermittelt. Die Auswertung beginnt an Tag 7, da an Tag 3 das erste Gewicht erhoben worden ist. An Tag 7 ist somit keine wöchentliche Zunahme, sondern lediglich eine Zunahme über 4 Tage belegt. Abb. 21A zeigt die wöchentlichen Zunahmen aller Tiere über zehn Wochen. Dabei sind die Zunahmen der Kontrollgruppe im Mittel an jedem untersuchten Zeitpunkt höher als die Zunahmen der Versuchsgruppe. Die Unterschiede der Zunahmen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe sind allerdings nur an Tag 7, 14, 42 und 63 signifikant. Auch hier wurde die Normalverteilung nach Shapiro-Wilk getestet und anschließend die Signifikanz mit dem t-Test oder dem Mann-Whitney-U Test analysiert. In beiden Tests wurde $p \leq 0,05$ angenommen. Betrachtet man die weiblichen Tiere (Abb. 21B), ist der Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe an Tag 14 und Tag 63 signifikant. Die Zunahmen beider Gruppen an den restlichen Untersuchungstagen sind nicht signifikant verschieden. Betrachtet man die männlichen Tiere (Abb. 21C), fällt auf, dass die absoluten Zunahmen vor allem in der Kontrollgruppe sehr groß sind. Da diese hohen Zunahmen aber vor allem bei Einzeltieren auftreten, resultiert daraus eine hohe Standardabweichung.

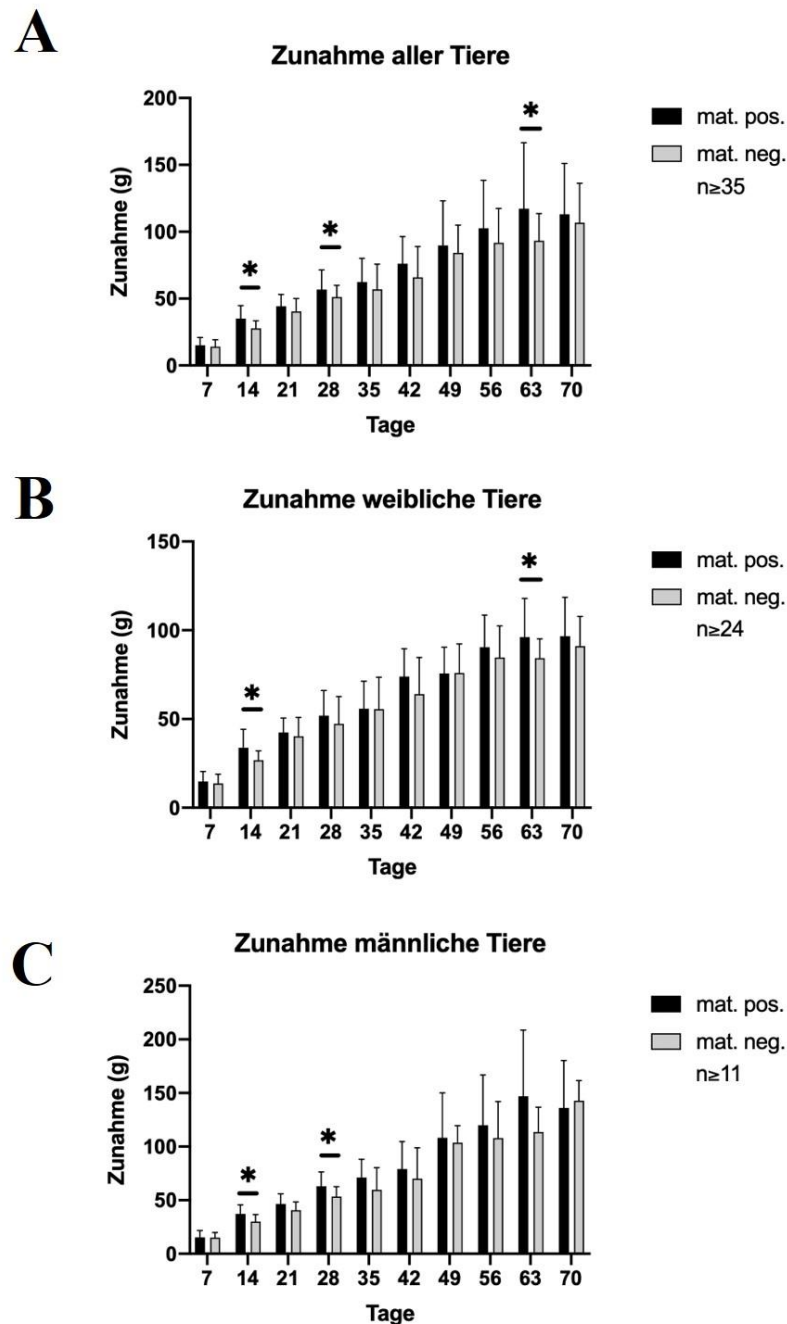


Abb. 21 Zunahmen der Versuchstiere

Aus den Gewichten aller Tiere wurde durch Subtraktion der vorherigen Messung vom aktuellen Gewicht die Zunahme ermittelt. A – Alle Tiere dargestellt. Höhere Zunahmen der Kontrollgruppe im Vergleich zur Versuchsgruppe mit teilweise signifikantem Unterschied. Ebenso bei der Gruppierung in weibliche (B) und männlichen Tieren (C). A-C: Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppe mit Standardabweichung. Normalverteilung getestet nach Shapiro-Wilk, anschließend t-Test oder Mann-Whitney-U Test ($p \leq 0,05$).

5.2.5. Durchflusszytometrische Analyse der PBMCs

Um eventuelle Unterschiede in der Zusammensetzung der Lymphozyten im Blut analysieren zu können, wurde an Tag 14 und Tag 63 ein Überblick über verschiedene Zellpopulationen der PBMCs per Durchflusszytometrie erstellt. Angefärbt wurden dabei B-Zellen, Monozyten/Makrophagen, sowie α/β T-Zellen und γ/δ T-Zellen mit entsprechenden anti-Huhn-Antikörpern (vgl. Tabelle 9). Aus Versuchs- und Kontrollgruppe wurden jeweils die gleichen 14 weiblichen Tiere für beide Versuchstage beprobt. Das Gating ist exemplarisch in Abb. 22 dargestellt.

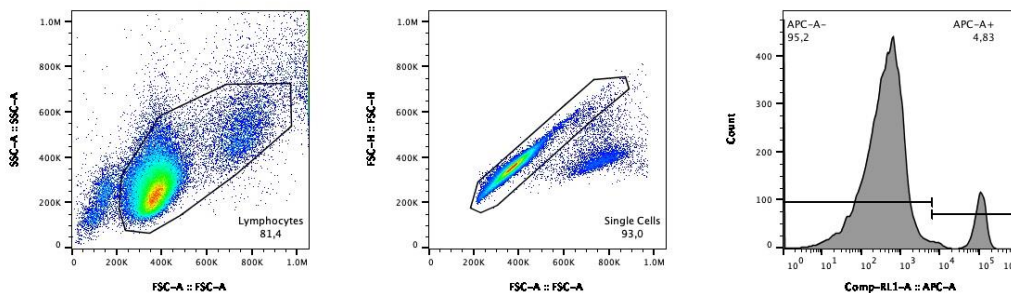


Abb. 22 Gating der PBMCs im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse

Die PBMCs wurden im FSC-SSC dargestellt und gegatet. In einem zweiten Gating wurde auf einzelnen Zellen eingegrenzt. Diese wurden dann auf die Färbung mit dem zu untersuchende Fluorochrom dargestellt.

In Abb. 24 ist der Mittelwert der relativen Prozentsätze mit Standardabweichung beider Gruppen dargestellt. Hierbei wurden die Daten mit dem Shapiro-Wilk Test auf die Normalverteilung getestet. Da eine Normalverteilung in allen Zellpopulationen vorlag, wurden die Werte mit einem t-Test auf ihre statistische Signifikanz untersucht ($p \leq 0,05$). Dabei ergab sich an Tag 14 ein signifikant kleinerer Prozentsatz an α/β , sowie an γ/δ T-Zellen in der Versuchsgruppe. B-Zellen und Monozyten waren nicht signifikant verschieden zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe.

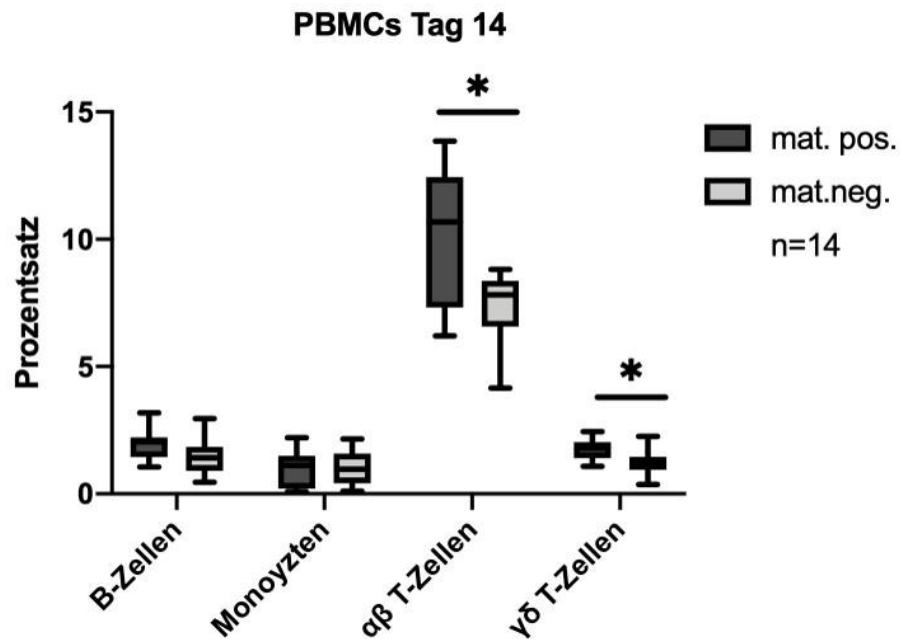


Abb. 24 Durchflusszytometrische Analyse der PBMCs an Tag 14

Analyse verschiedener Zellpopulationen im Blut weiblicher Tiere. Normalverteilung getestet mit Shapiro-Wilk, Signifikanz mit t-Test ($p \leq 0,05$). Ein Wert lag im 3.IQR und wurde ausgeschlossen.

An Tag 63 wurde das gleiche Vorgehen wie an Tag 14 durchgeführt. Die relativen Prozentsätze der Zellpopulationen sind in Abb. 23 dargestellt. Wie aus Abb. 23 ersichtlich ist, zeigt die Versuchsgruppe weiterhin einen signifikant niedrigeren Prozentsatz für γ/δ T-Zellen. Alle anderen Zellpopulationen zeigen keine signifikanten Unterschiede.

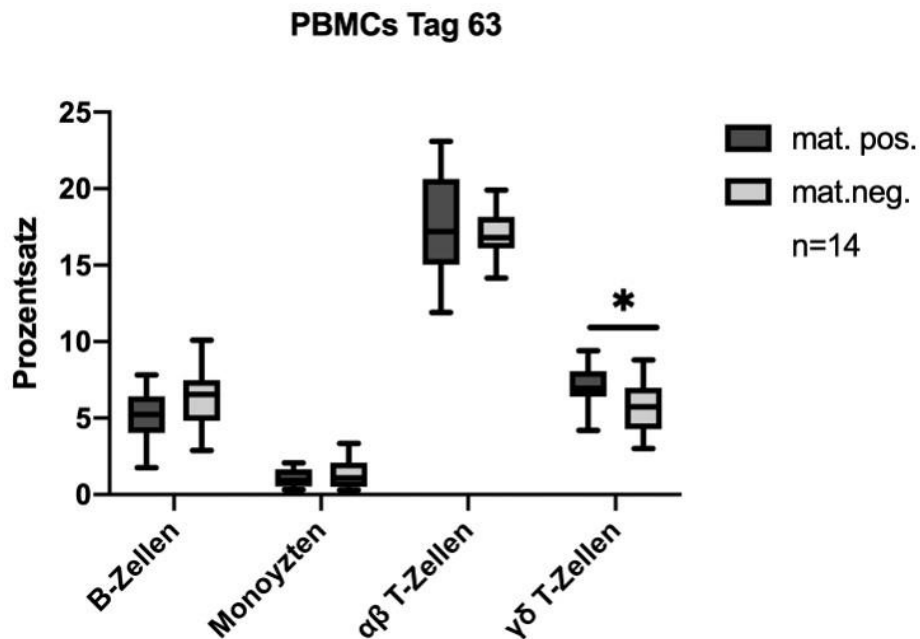


Abb. 23 Analyse der PBMCs an Tag 63 mittels Durchflusszytometrie

Die nach Gradientenzentrifugation isolierten PBMCs wurden mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert und danach mit einem APC-konjugiertem Sekundärantikörper gefärbt. Eine Lebend-Tot-Färbung mit 7AAD wurde angewandt. t-Test mit $p \leq 0,05$.

5.2.6. Vergleich der Antikörperproduktion im Blutplasma

Für die quantitative Entwicklung der Antikörperspiegel im Blut wurden für IgY, IgM und IgA Titer an verschiedenen Zeitpunkten per ELISA gemessen und zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe verglichen (siehe 4.14). Da bei den durchgeführten ELISAs eine Positivkontrolle mit bekannter Konzentration mitgeführt worden ist (Standard), konnte anhand dessen Kurve über eine Regressionsrechnung die absolute Menge an IgY, IgM und IgA im Blutplasma der Versuchstiere errechnet werden.

In den folgenden Abbildungen ist immer der Mittelwert aller Tiere jeder Gruppe sowie die zugehörige Standardabweichung dargestellt. Für die per Regression errechneten Werte wurden die Tiere in „alle Tiere“ sowie zusätzlich in „nur weibliche“ und „nur männliche“ Tiere gruppiert.

Antikörper vom Isotyp IgM sind im Rahmen der Primärantwort die ersten gebildeten Immunglobuline. Dennoch machen sie im Huhn nur einen kleinen Anteil der maternalen Antikörper aus. Abb. 25 zeigt den Verlauf der IgM Titer von Versuchs- und Kontrollgruppe über den Versuchszeitraum (vgl. Tabelle 15). In Abb. 26 sind die anhand einer Regressionsgleichung errechneten absoluten Werte an IgM Antikörpern im Blutplasma angegeben. Dabei zeigt Abb. 25, dass die Mittelwerte beider Gruppen sehr ähnlich sind, was sich auch in den errechneten Serumwerten in Abb. 26 widerspiegelt. Der Titer an IgM Antikörpern ist zum Zeitpunkt des Schlupfes sehr niedrig und steigt kontinuierlich über den Versuchszeitraum an. Am 3. Lebenstag ist in der Versuchsgruppe signifikant weniger IgM nachweisbar als in der Kontrollgruppe. Dieser signifikante Unterschied ist an Tag 7 ebenfalls gegeben, betrachtet man alle Tiere oder die männlichen Tiere (Abb. 26). An den restlichen Versuchstagen sind die Mittelwerte beider Gruppen ähnlich hoch, auch wenn die Versuchsgruppe in der Tendenz höhere Werte an IgM Antikörpern im Blut hat als die Versuchsgruppe.

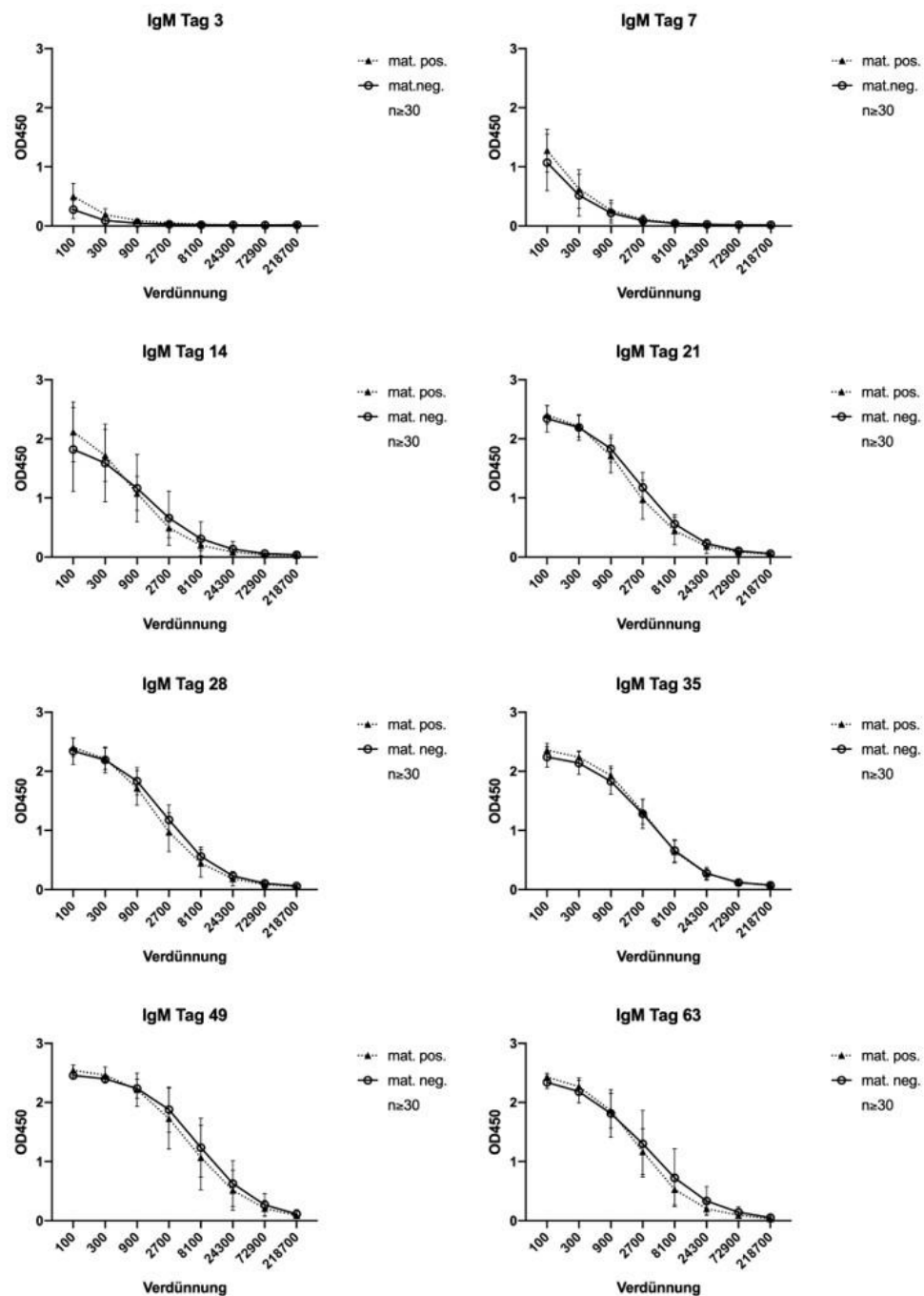


Abb. 25 IgM Nachweis von Versuchs- und Kontrollgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten

Ermittelt per ELISA werden hier die Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung von Versuchs- (mat. neg.) und Kontrollgruppe (mat. pos.) dargestellt. Das Plasma wurde 1:100 log3 verdünnt. Die Titer steigen über die Zeit kontinuierlich an, die Kurvenverläufe beider Gruppen sind annähernd identisch.

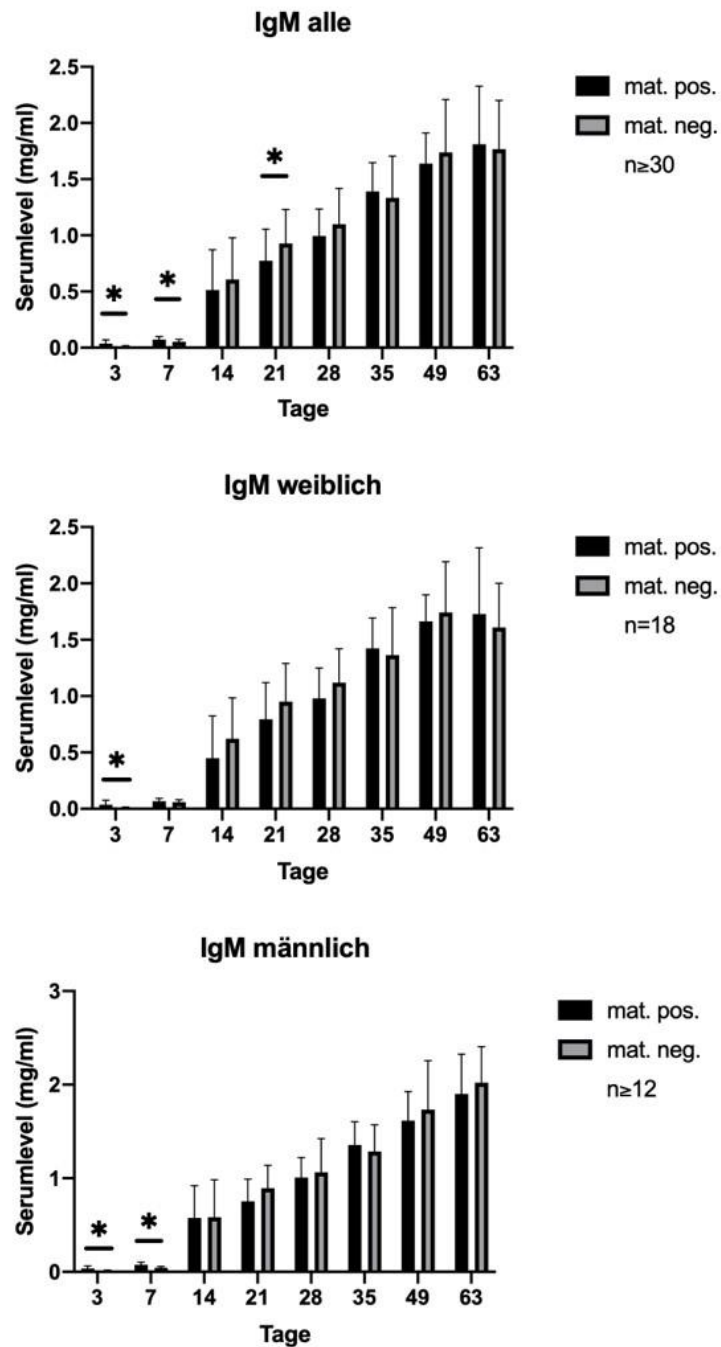


Abb. 26 Quantifizierung von IgM im Blutplasma der Versuchstiere

Per Regression errechnete Werte an IgM Antikörpern zu verschiedenen Zeitpunkten. Zu frühen Entnahmezeitpunkten hat die Versuchsgruppe signifikant weniger IgM. Ab Tag 14 gleichen sich die Titer an. Dargestellt ist der Mittelwert jeder Gruppe inklusive Standardabweichung. Die Normalverteilung wurde mit Shapiro-Wilk getestet, anschließend wurde mit einem t-Test oder einem Mann-Whitney-U Test die Signifikanz getestet ($p \leq 0,05$).

IgY Antikörper machen den größten Anteil der maternalen Antikörpern aus, die von der Henne in den Dotter gegeben werden. Diese Besonderheit ist in Abb. 27 sowie in Abb. 28 zu sehen. Die Kontrollgruppe zeigt an Tag 3, 7 und Tag 14 deutliche IgY Titer, wohingegen die Tiere der Versuchsgruppe erst ab Tag 14 Antikörper vom Isotyp IgY im Blutplasma haben. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist in allen Gruppierungen an Tag 3, 7 und 14 signifikant. Im weiteren Verlauf steigt die Menge an IgY Antikörpern in beiden Gruppen an, wobei die Versuchsgruppe augenscheinlich niedrigere Werte hat. An Tag 35 ist dieser Unterschied für alle Gruppierungen rechnerisch signifikant und dies ebenso für die männlichen Tiere an Tag 35 ($p \leq 0,05$ im t-Test).

Antikörper vom Isotyp IgA werden hauptsächlich in Sekreten und an Schleimhautoberflächen sezerniert. Der Anteil an IgA Antikörpern, die an das Küken übertragen werden, ist sehr gering. Da IgA im Blut nur in sehr geringen Mengen detektierbar ist, ist die Standardabweichung zwischen den Versuchstieren sehr hoch. Abb. 29 zeigt IgA spezifische ELISAs von verschiedenen Zeitpunkten. Da es für Hühner-IgA keinen kommerziell erhältlichen Standard gibt, wurde für die Regressionsanalyse ein kalibriertes Serum verwendet (siehe Tabelle 11). Abb. 30 zeigt die Mittelwerte von Versuchs- und Kontrollgruppe für jeden untersuchten Tag in $\mu\text{g/ml}$ inklusive der zugehörigen Standardabweichung. Dabei zeigt sich ein rechnerisch signifikant niedriger IgA Spiegel für die Versuchsgruppe am 3. Lebenstag sowie für die Gruppierung aller Tiere an Tag 7. Ab Tag 14 liegt der Mittelwert beider Gruppen für Antikörper des Isotyps IgA im Blutplasma über den weiteren Versuchszeitraum bei ca. $25 \mu\text{g/ml}$.

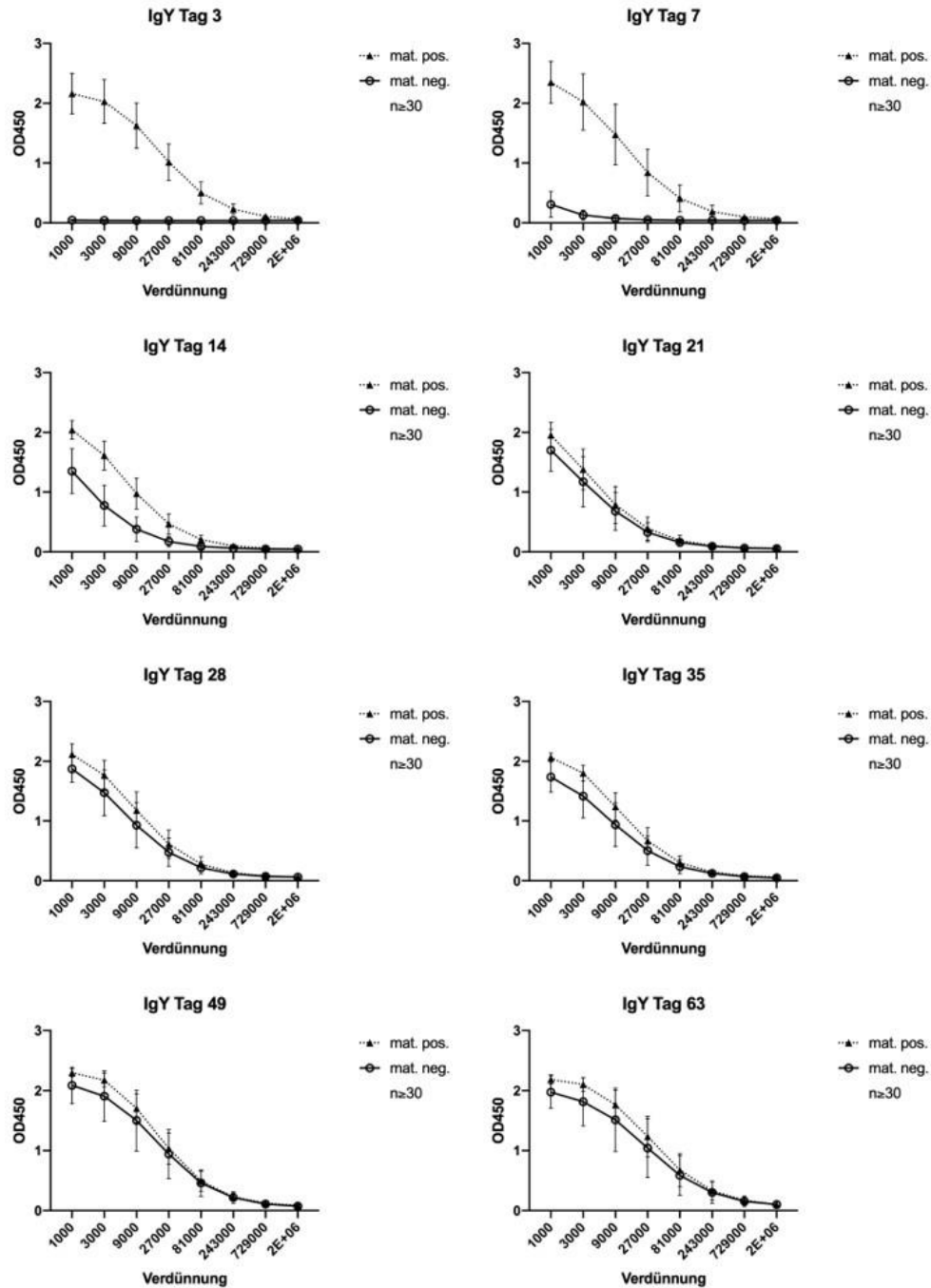


Abb. 27 Mittelwerte der IgY Spiegel im Blut

Mittels ELISA gemessene IgM Titer aus dem Blutplasma 1:1000 log3 verdünnt. Die Kurve verbindet die Mittelwerte jeder Gruppe, an jedem Zeitpunkt ist zusätzlich die Standardabweichung dargestellt. Die Kontrollgruppe hat hohe Titer an maternalen Antikörpern, die dann abfallen und ab Tag 14 wieder ansteigen. Die Versuchsgruppe hat keine maternalen Antikörper, aber ab Tag 21 sind die Titer denen der Kontrollgruppe ähnlich.

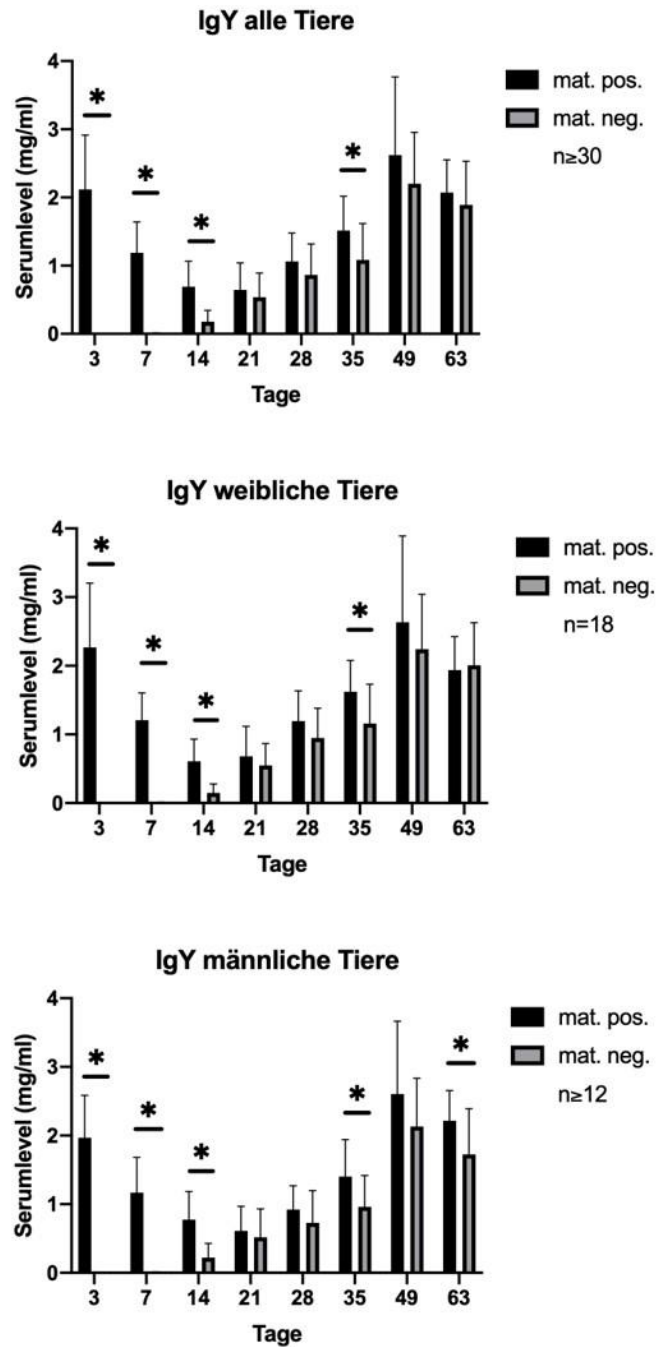


Abb. 28 Serumwerte von IgY im Blutplasma

Vergleich der per Regression errechnete Serumwerte von IgY zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe hat an Tag 3, 7 und 14 hohe Titer an maternalen Antikörpern. In der Versuchsgruppe sind ab Tag 14 IgY Antikörper detektierbar. Im weiteren Verlauf hat die Kontrollgruppe höhere Werte an IgY Antikörpern, an Tag 35 mit signifikantem Unterschied. Dargestellt ist der Mittelwert aller Tiere einer Gruppe mit zugehöriger Standardabweichung. Normalverteilung getestet mit Shapiro-Wilk, anschließend t-Test oder Mann-Whitney-U Test ($p \leq 0,05$).

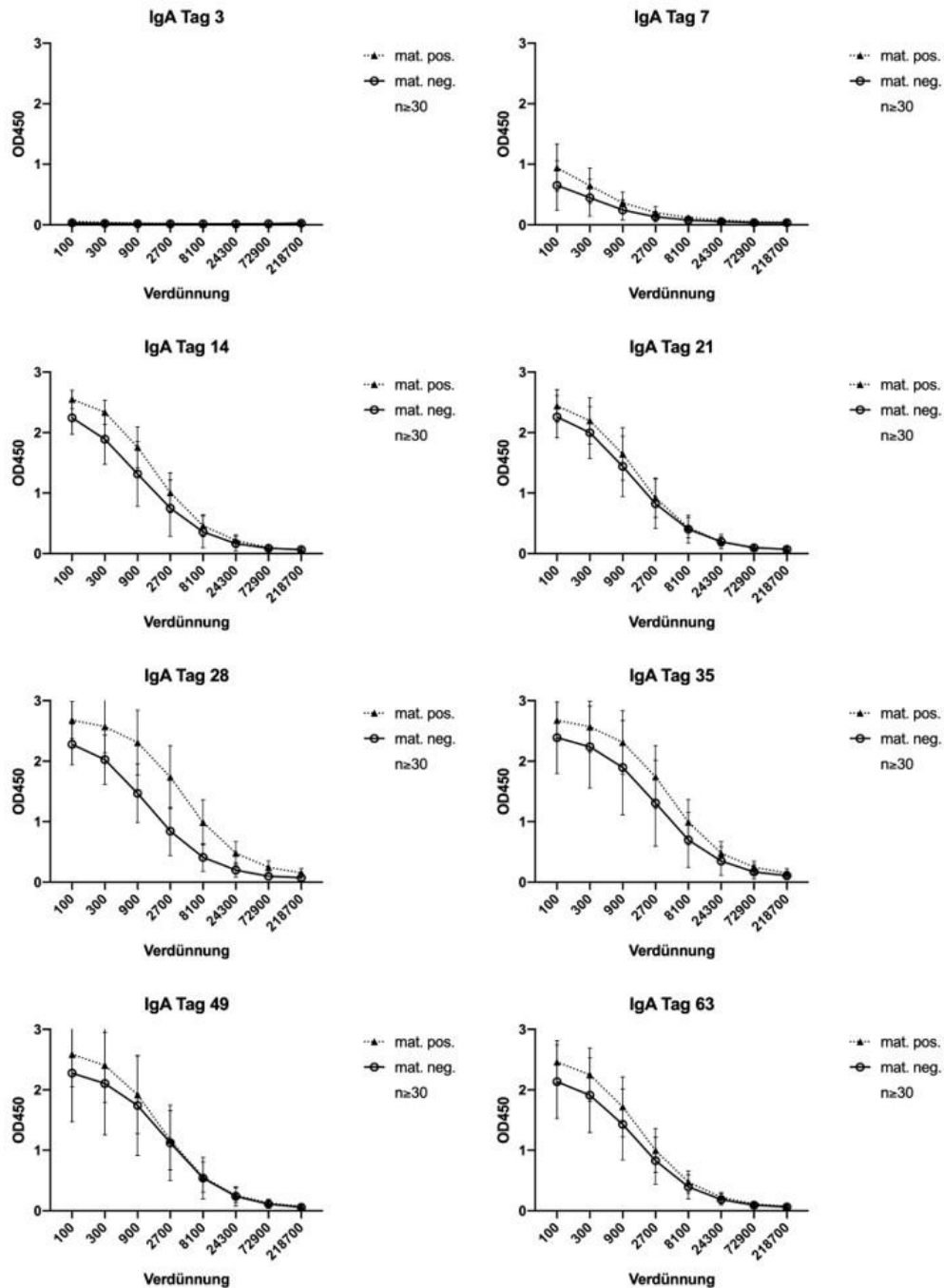


Abb. 29 IgA Spiegel im Blutplasma zu verschiedenen Zeitpunkten

Mittelwerte der IgA ELISAs von Versuchs- und Kontrollgruppe mit zugehöriger Standardabweichung. Das Blutplasma wurde 1:100 log3 verdünnt. An Tag 3 ist in beiden Gruppen kein Titer zu erkennen, ab Tag 7 steigen die Titer kontinuierlich an. Dabei hat die Versuchsgruppe niedrigere Mittelwerte, aber die Standardabweichung beider Gruppen ist hoch.

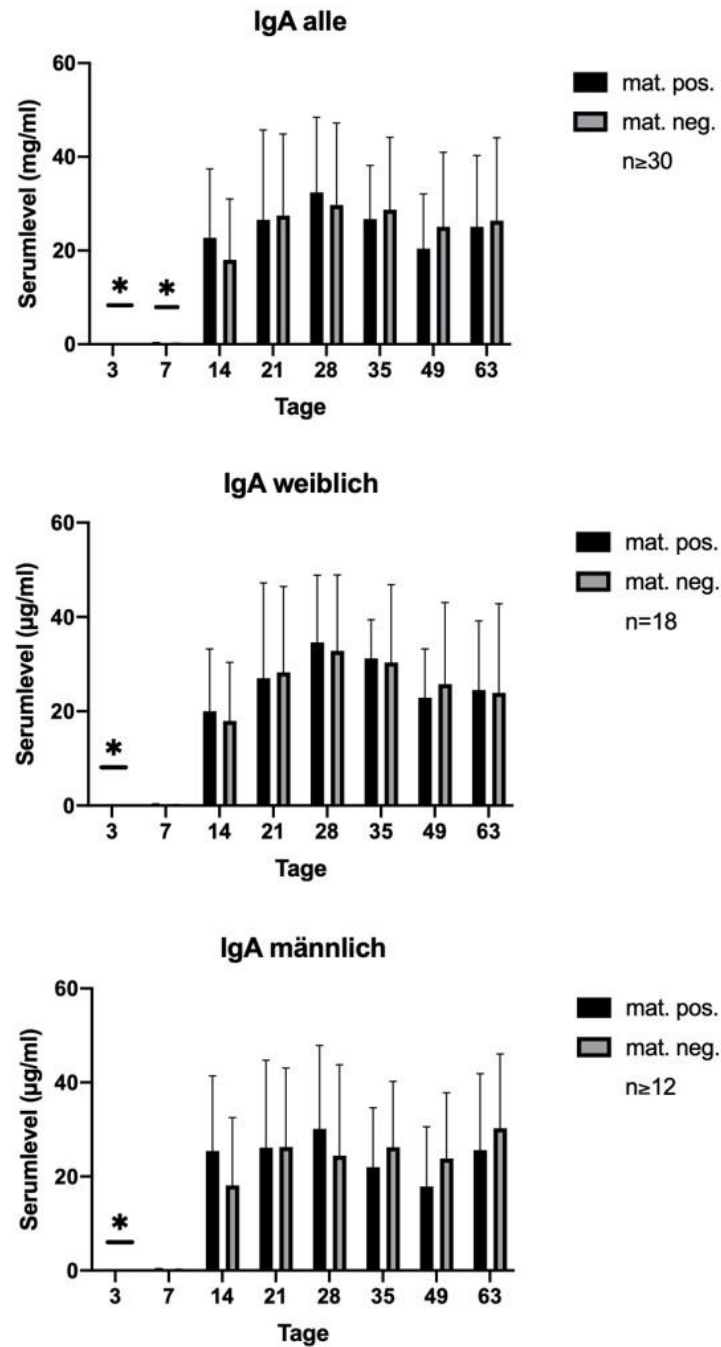


Abb. 30 Regression des IgA Titors im Blutplasma

An Tag 3 und 7 ist sehr wenig IgA detektierbar, aber es ist rechnerisch signifikant weniger IgA im Blutplasma der Versuchsgruppe. Ab Tag 14 ist der Titer in beiden Gruppen ähnlich hoch, allerdings mit großer Standardabweichung. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tiere jeder Gruppe. Die Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test getestet, anschließend erfolgte ein t-Test oder der Mann-Whitney-U Test zur Feststellung der Signifikanz ($p \leq 0,05$).

5.2.7. IgA Expression in der Cäcaltonsille

Da IgA hauptsächlich an Oberflächen und damit z.B. vermehrt im Darm vorkommt, wurden die Cäcaltonsillen je sieben weiblicher Tiere jeder Gruppe mittels qPCR auf die Expression von IgA analysiert (siehe 4.11). Dabei wurde die Expression in der Kontrollgruppe gleich eins gesetzt und dient somit als Referenzwert. Abb. 31 zeigt, dass die Versuchsgruppe einen Expressionswert von 1,2 gegenüber der Kontrollgruppe für IgA hat.

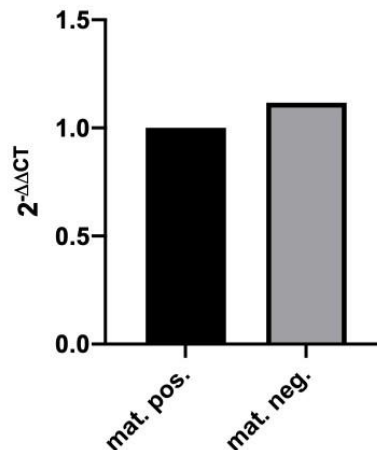


Abb. 31 IgA Expression der Cäcaltonsille

Dargestellt wird der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Wert, welcher für die Kontrollgruppe gleich eins definiert wurde. Die Versuchsgruppe hat einen Wert von 1,2 – die IgA Expression ist also sehr ähnlich. Analysiert wurden pro Gruppe sieben weibliche Tiere.

5.2.8. Immunisierung mit KLH

Um die Fähigkeit der Versuchsgruppe, Antikörper gegen ein spezifisches Antigen zu bilden, spezifischer untersuchen zu können, wurden die Versuchstiere *intramuskulär* mit KLH (siehe 4.2.3, sowie Tabelle 15) immunisiert. Die von den Versuchstieren gebildeten anti-KLH Antikörper wurden mittels ELISA nachgewiesen. Eine Quantifizierung ist nicht möglich, da es keinen entsprechenden Standard gibt.

5.2.8.1. Keine Detektion von KLH spezifischen Antikörpern vor Immunisierung

Das vor der Immunisierung an Tag 35 entnommene Blutplasma wurde auf das Vorliegen anti-KLH spezifischer Antikörper untersucht. Abb. 32A zeigt, dass vor Immunisierung keine IgM spezifischen anti-KLH Antikörper nachweisbar sind. Ebenso sind keine anti-KLH IgY Antikörper detektierbar (Abb. 32B).

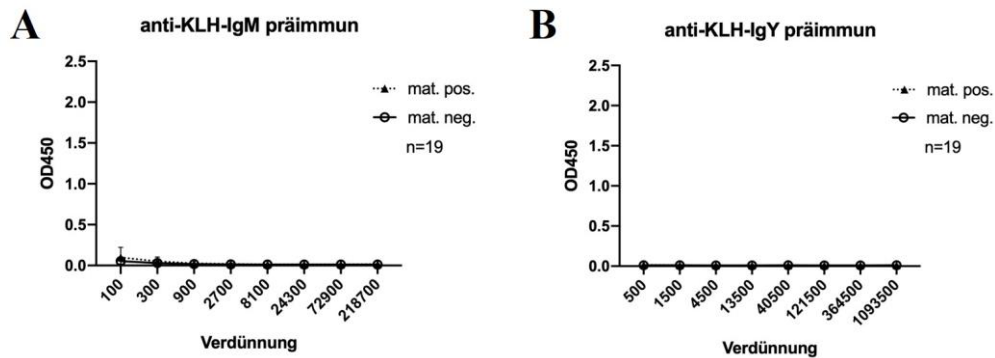


Abb. 32 anti-KLH ELISA aus Blutplasma vor Immunisierung

Das Blutplasma wurde 1:100 log3 für IgM (A) bzw. 1:500 log3 für IgY (B) verdünnt. Die Beschichtung erfolgte mit 10 µg/ml KLH, die Detektion erfolgte mit einem isotypspezifischen Peroxidase gekoppeltem Antikörper. Vor Immunisierung der Tiere sind weder KLH spezifische IgM, noch KLH spezifische IgY Antikörper detektierbar.

5.2.8.2. Verlauf der anti-KLH spezifischen Immunglobulintiter nach Immunisierung

In Abb. 33 sind anti-KLH IgM spezifische ELISAs dargestellt, jeweils an D7 (A), D21 (B) und D35 (C) nach Immunisierung. Dabei sind in der ersten Grafik alle Tiere zusammengefasst und dann nur weibliche und nur männliche Tiere gezeigt. Die Kurve verbindet dabei die Mittelwerte jeder Gruppe. Die Standardabweichung ist für jede Verdünnungsstufe eingezeichnet. Für anti-KLH Antikörper des Isotyps IgM ist ein Titer schon an Tag 7 p.i. nachweisbar

Entsprechend der IgM spezifischen ELISAs wurden mittels ELISA auch anti-KLH Antikörper des Isotyps IgY detektiert. Abb. 34 zeigt die Mittelwerte von Versuchs- und Kontrollgruppe an D7 (A), D21 (B) und D35(C) p.i. Die Kurvenverläufe von Versuchs- und Kontrollgruppe sind annähernd identisch. An D7 p.i. sind beide Kurven noch hyperbol, an D21 und D35 sind sie sigmoidal.

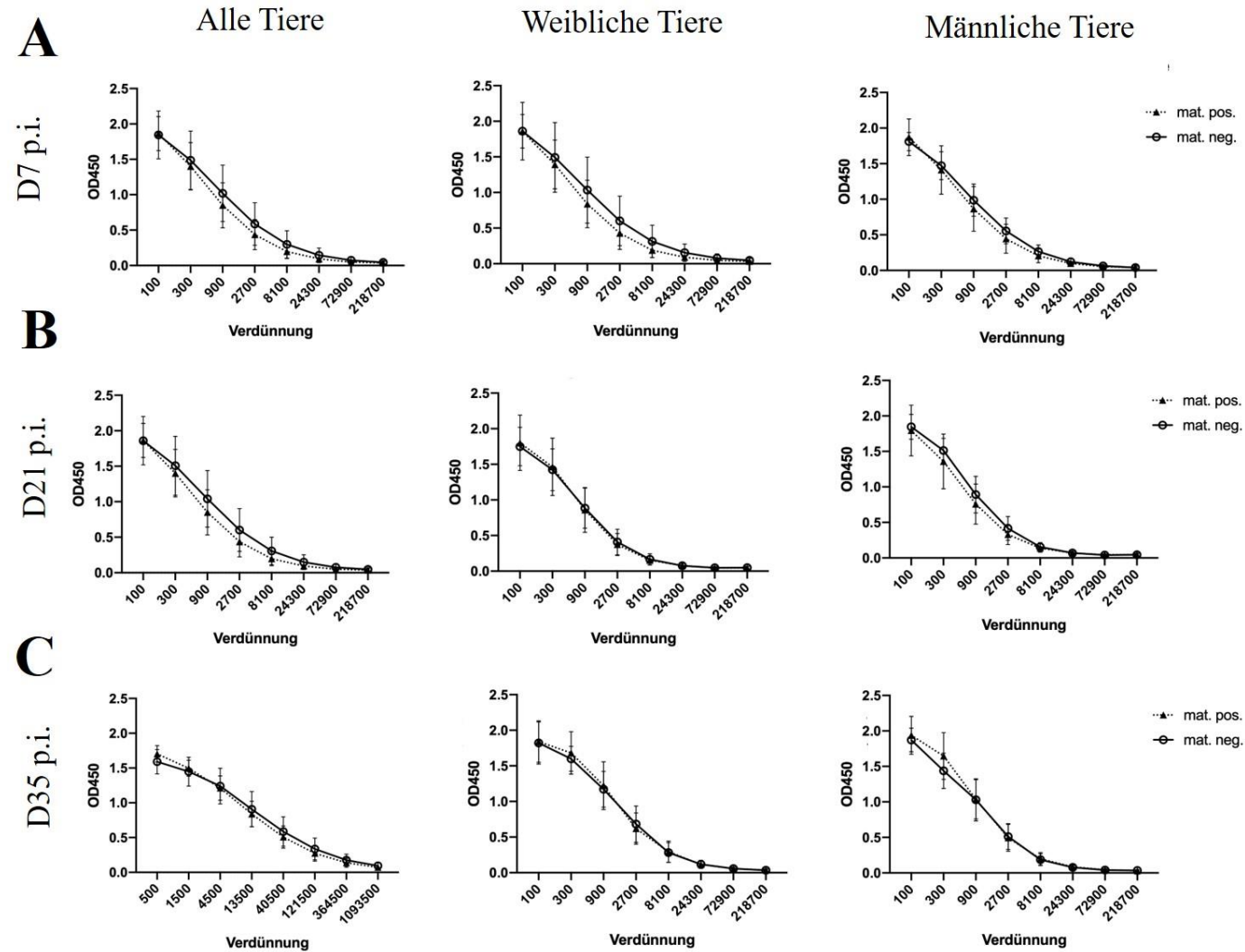


Abb. 33 ELISA auf IgM spezifische anti-KLH Antikörper

An D7 (A), D21 (B) und D35 (C) p.i. nachgewiesene anti-KLH IgM Titer. Das Blutplasma wurde 1:100 verdünnt und log3 pipettiert. Die Kurve verbindet die Mittelwerte, zu jedem Mittelwert wurde die zugehörige Standardabweichung eingezeichnet. $n \geq 19$, davon mindestens 13 weibliche und 6 männliche.

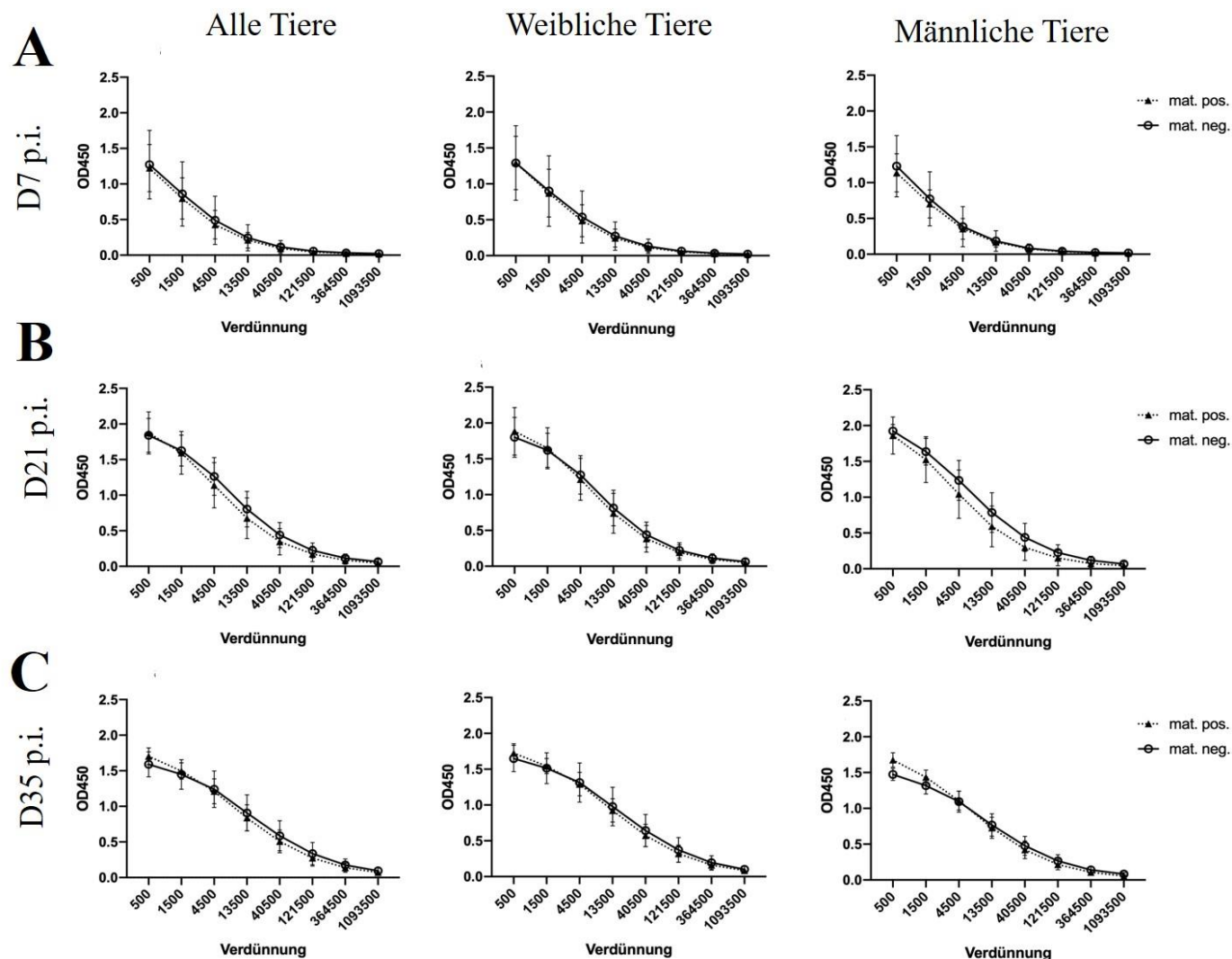


Abb. 34 Detektion IgY spezifischer anti-KLH Antikörper

Nachweis per ELISA, Blutplasma 1:500 log3 verdünnt. D7 (A), D21 (B) und D35(C) p.i. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tiere eine Gruppe inklusiv Standardabweichung. Die Titer beider Gruppen verlaufen annähernd identisch. An D7 p.i. steigt der Titer an, an D21 und D35 p.i. sind die Kurven sigmoidal. $n \geq 19$, davon mindestens 13 weibliche und 6 männliche

5.3. Analyse des Antikörperrepertoires im Haushuhn

Die Generierung eines möglichst vielfältigen Antikörperrepertoires ist wichtig, um den Organismus bestmöglich vor Infektionen zu schützen. Um einen Überblick über das im Huhn generierte Antikörperrepertoire zu bekommen, wurde die variable Region der schweren Kette isotypspezifisch sowie die leichte Kette amplifiziert und per Next-Generation-Sequencing analysiert. Dazu wurden für die Etablierung der Technologie die PBMCs von drei weiblichen WT-Hennen am 3. sowie am 28. Lebenstag verwendet. Zu beachten war bei der Amplifikation der VDJ-Fragmente der variablen Regionen die Verwendung von Barcode-markierten Primern bei der Sequenzierung durch die Firma Novogene (UK) Company Ltd. bzw. die Verwendung der Illumina-Adapter bei der Sequenzierung mit Eurofins Genomics Germany GmbH (siehe Tabelle 6).

5.3.1. Amplifikation der variablen Region der Immunglobuline

Die Amplifikation der leichten Immunglobulin Kette erfolgte wie unter 4.6.3 beschrieben. Das amplifizierte Fragment ist 350 bp groß und umfasst sowohl die variable Region als auch Teile der konstanten Region. Abb. 35 zeigt das Bild einer Gelelektrophorese der drei Versuchstiere an Tag 28.

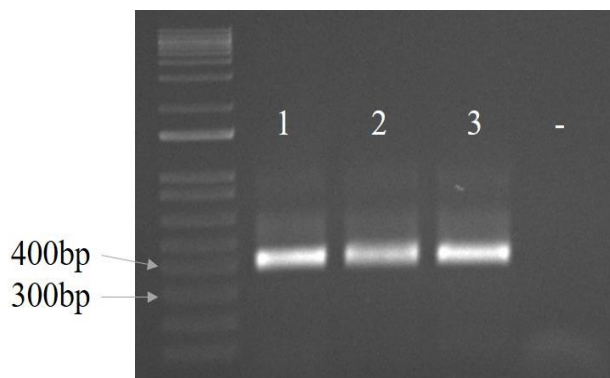


Abb. 35 Amplifikation der leichten Immunglobulinkette

Im Zuge der Sequenzierung des Antikörperrepertoires wurde die VJ Region der leichten Kette von drei Tieren an Tag 28 amplifiziert. Das Fragment hat eine Größe von 350 bp

Für die schwere Kette war es von besonderem Interesse, die verschiedenen Isotypen differenzieren zu können. Deshalb wurde hier die cDNA mit isotypspezifischen Reverse-Primern synthetisiert (siehe 4.5), und auf diesen isotypspezifischen cDNAs wurde die variable Region amplifiziert (siehe 4.6.3). Das Prinzip der

Isotypspezifischen cDNA Synthese sowie die Amplifikation der variablen Region auf den isotypspezifischen cDNAs ist in Abb. 36 dargestellt.

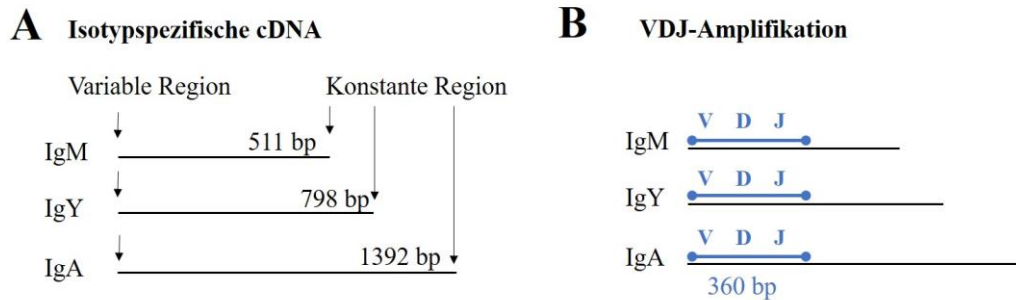


Abb. 36 Schema der isotypspezifischen VDJ-Amplifikation

A- Synthese von isotypspezifischer cDNA. Der forward-Primer ist bei IgM, IgY und IgA gleich, der reverse-Primer wurde in der konstanten Region gewählt und amplifiziert so nur IgM, IgY oder IgA-Antikörper. B- Auf jeder isotypspezifischen cDNA wird das VDJ-Fragment durch die gleiche PCR amplifiziert. Das Amplikon ist also immer 360 bp lang, kann aber durch die Verwendung von Barcodes/Adaptoren individuell gekennzeichnet werden.

Das VDJ-Fragment ist für alle Isotypen 360 bp groß und in Abb. 37 für alle drei Tiere und drei Isotypen an Tag 3 dargestellt.

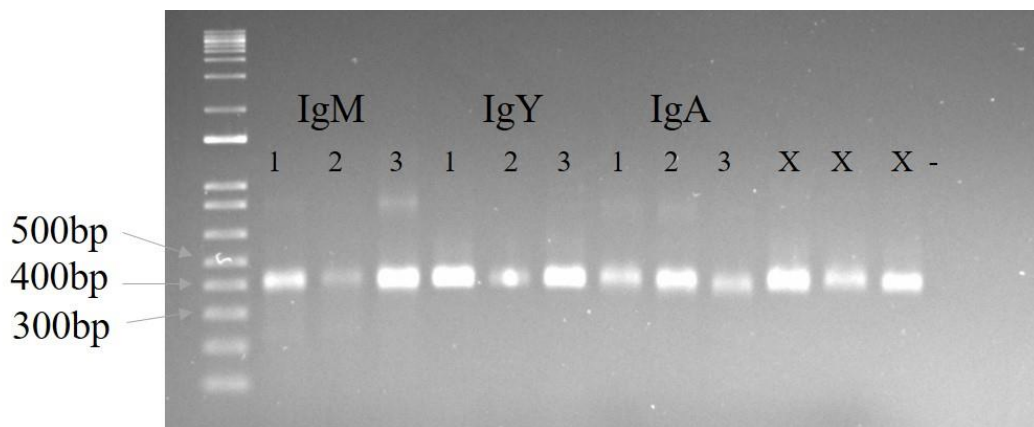


Abb. 37 VDJ-Amplifikation auf isotypspezifischer cDNA

Für die Sequenzierung des Antikörperrepertoires der schweren Kette wurde die VDJ-Region (360 bp) von drei Tieren im Alter von 4 Wochen auf isotypspezifischer cDNA amplifiziert.

Nach Aufreinigung dieser Proben wie unter 4.8 beschrieben, wurden die Proben der IgM-spezifischen Antikörper von den drei Tieren an je Tag 3 und Tag 28 zum Sequenzieren mit Novogene (UK) Company Ltd. geschickt. Dabei wurden 500.000 Reads pro Probe garantiert. Für einen direkten Vergleich wurden dieselben Proben bei Eurofins Genomics Germany GmbH mit 80.000 Reads im NGSelect Amplicon 2nd PCR Verfahren analysiert. Die variable Region der leichte Kette wurde nur bei

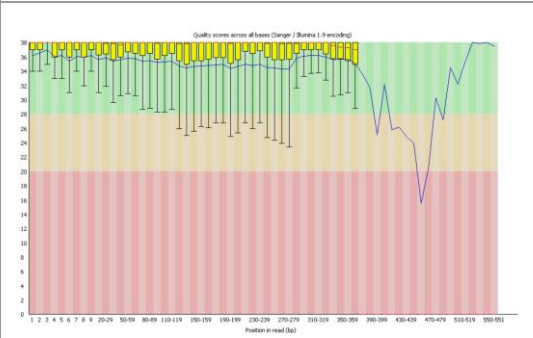

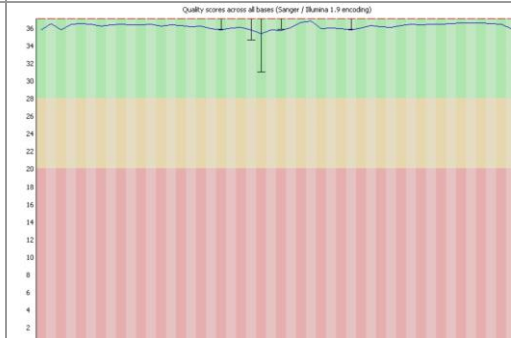
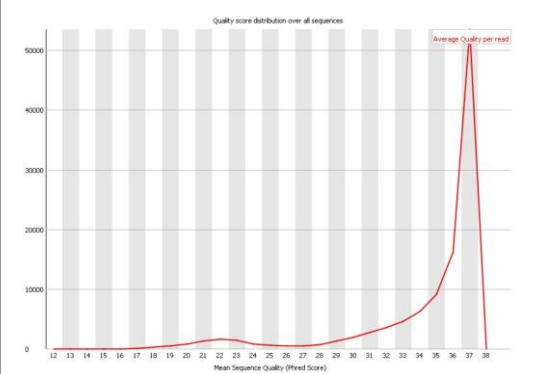
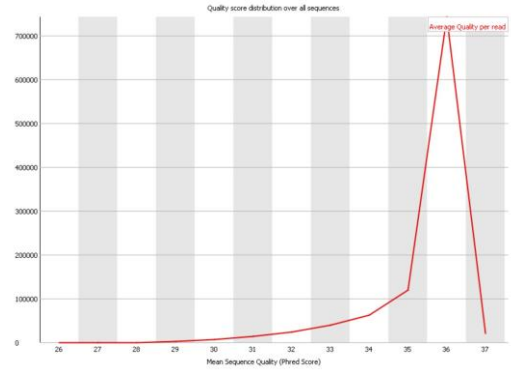
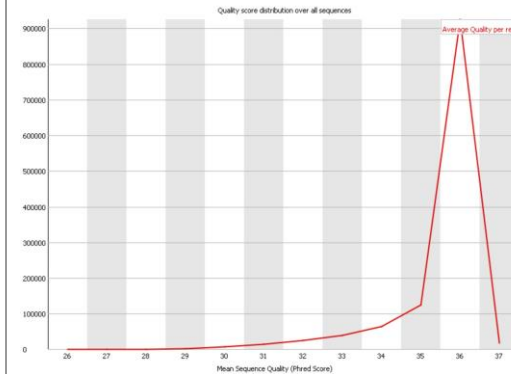
Novogene im Amplicon-Sequencing mit 500.000 reads analysiert.

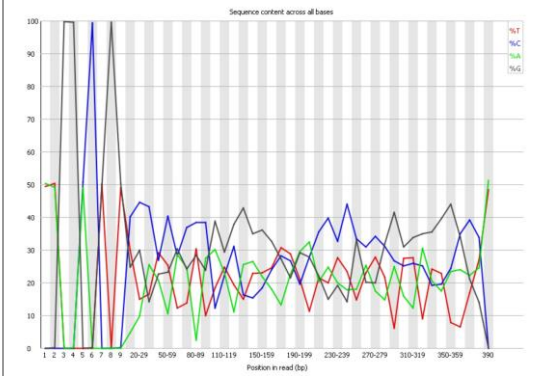
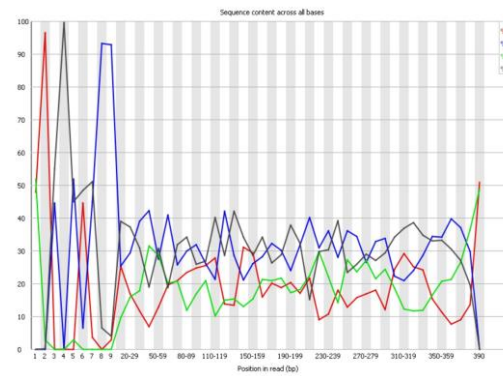
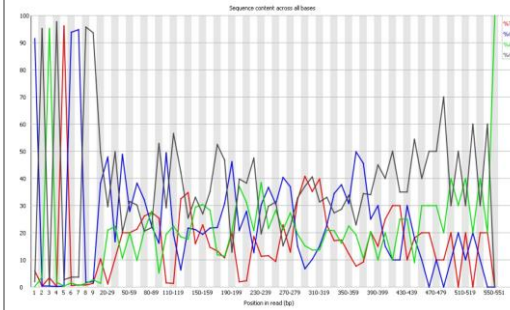
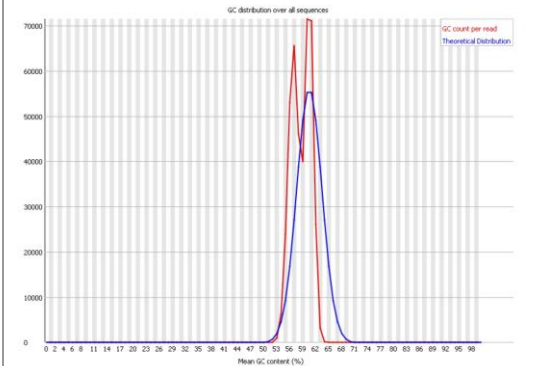
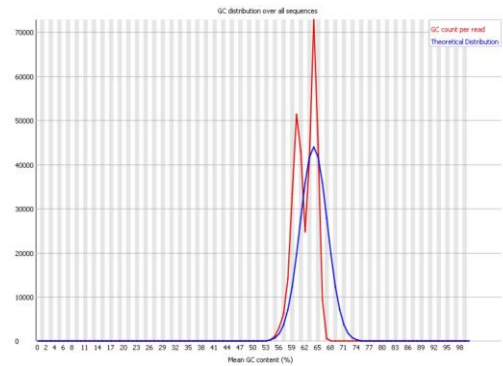
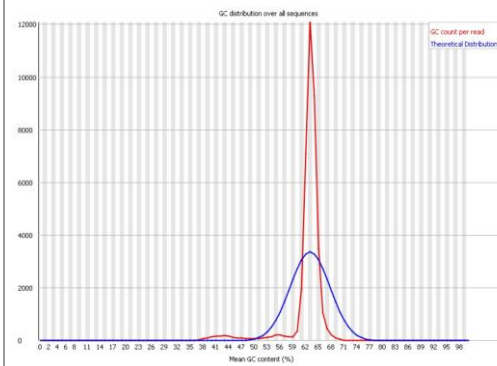
5.3.2. Auswertung der NGS-Daten mit FastQC

Zur Qualitätskontrolle der NGS-Daten wurde das Programm FastQC verwendet. Im Folgenden werden die einzelnen Qualitätskontrollen anhand je einer repräsentativ gewählten Probe pro Isotyp und Firma gezeigt (siehe Tabelle 16). Dargestellt sind eine Probe von IgM Tag 28 sequenziert mit Eurofins sowie mit Novogene und eine Probe von IgL Tag 28 sequenziert mit Novogene. Die analysierten Parameter sind dabei die Qualität jeder Base der Sequenz, die Qualität der Sequenzen im Mittel, der Basen- bzw. GC-Gehalt der Sequenz, die durchschnittliche Sequenzlänge und das Vorkommen von Duplikationen.

Die Qualität der Basen ist bei allen Proben sehr gut. Die Qualität der von Eurofins sequenzierten Probe hat dabei eine höhere Standardabweichung als die Proben von Novogene. Der Basengehalt der Sequenz ist bei allen analysierten Proben inkonstant. Der GC-Gehalt der Sequenz liegt deutlich über dem erwarteten Wert. Für die durchschnittliche Sequenzlänge zeigen die IgM Proben einen zweigeteilten Peak, wohingegen die IgL Probe gleichmäßig verteilt ist. Außerdem liegen in allen Proben Duplikationen vor.

Eine Auswertung und Interpretation der Daten ist derzeit noch nicht möglich.

Parameter	IgM Eurofins	IgM Novogene	IgL Novogene
Anzahl an Sequenzen	109.968	1.039.980	1.225.556
Qualität jeder Base der Sequenz			
Qualität der Sequenzen im Mittel			

Basengehalt der Sequenz**GC-Gehalt der Sequenz**

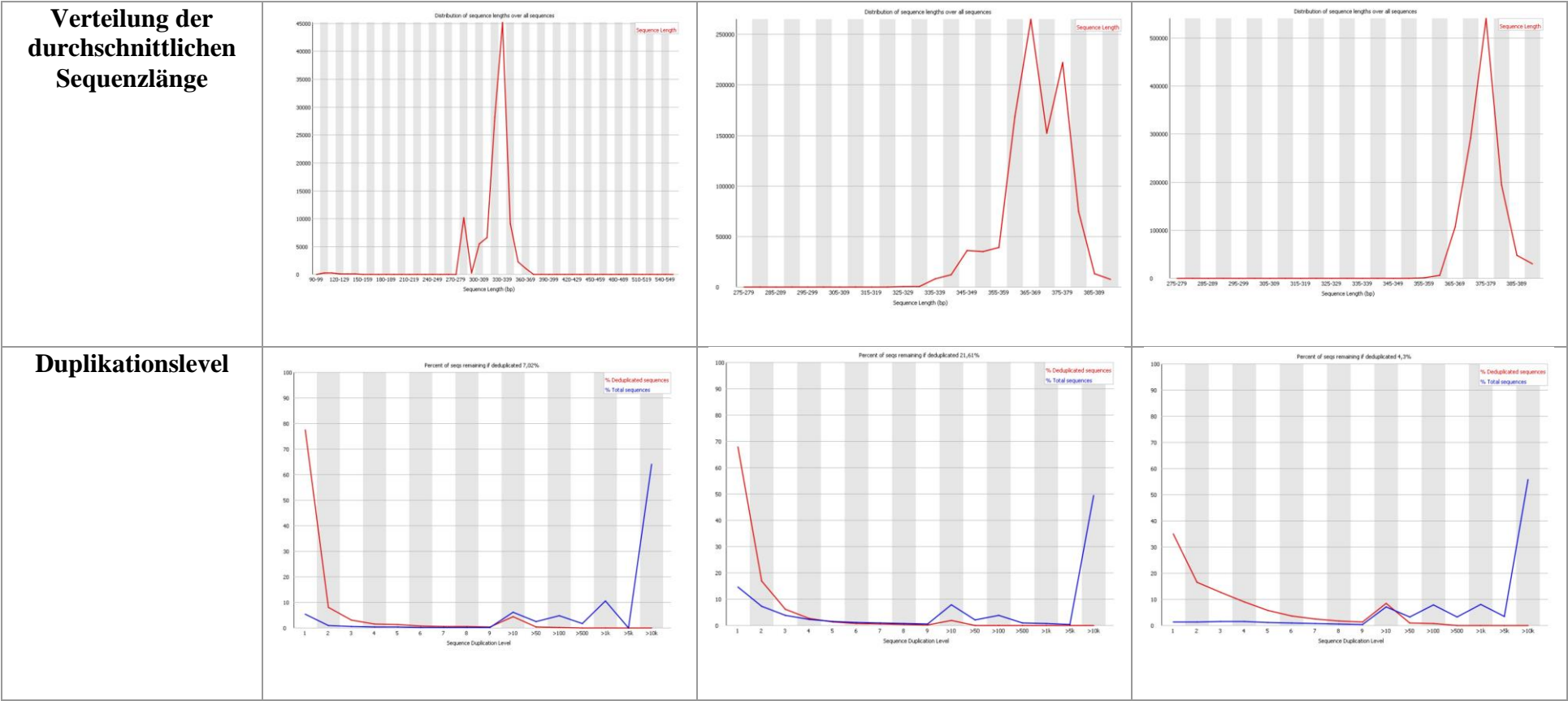


Tabelle 16 Qualitätskontrolle der analysierten NGS-Daten mit FastQC

6. DISKUSSION

6.1. Besiedelung der Bursa durch B-Zellen in JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren

Im Genom des Menschen ist das Rearrangement der schweren Kette die Voraussetzung für das Rearrangement der leichten Kette und somit würde ein Knockout der schweren Immunglobulinkette das Gen-Rearrangement der leichten Immunglobulinkette verhindern [6]. Im Huhn erfolgen die Rearrangements von schwerer und leichter Immunglobulinkette zur gleichen Zeit [8]. Um das Gen-Rearrangement im Huhn komplett zu blockieren und die Folgen dieser Modifikation auf die B-Zell Entwicklung zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Hühner generiert, die sowohl ein Knockout der schweren Immunglobulinkette als auch ein Knockout der leichten Immunglobulinkette haben.

6.1.1. Phänotyp der JH^{-/-} IgL^{-/-} Tiere

Die in dieser Arbeit erzeugten JH^{-/-} IgL^{-/-} Tiere entstanden durch Anpaarung von JH^{-/-} und IgL^{-/-} Tieren. Die Tiere der F₁-Generation hatten einen JH^{+/-} IgL^{+/-} Genotyp und wurden wiederum untereinander verpaart. Aus dieser Anpaarung entstand im Verhältnis 1:16 ein JH^{-/-} IgL^{-/-} Tier. Durch Genotypisierungs-PCR konnten JH^{-/-} IgL^{-/-} Embryonen identifiziert werden. Da weder bei der Charakterisierung der JH-KO Tiere noch bei den IgL-KO Tieren Unterschiede im Bezug auf Körpergewicht oder die Zellpopulationen der PBMCs auffielen, wurden die JH^{-/-} IgL^{-/-} Tiere nicht dahingehend untersucht [1, 2].

In der B-Zell Entwicklung ist die Einwanderung der B-Zellen in die Bursa ein wichtiger Schritt für die weitere Reifung der Zellen. Da Zellen, die in die Bursa eingewandert sind, ein funktional rearrangiertes sIg auf ihrer Oberfläche tragen, wird vermutet, dass die Expression des sIg für diese Einwanderung nötig ist [14, 21, 119]. Versuche von Sayegh et al. zeigen, dass die Funktionalität des sIg nicht ausschlaggebend für die Proliferation der Zellen ist [29]. Aber auch die alleinige Expression des sIg ist nicht ausschlaggebend für die Migration und Proliferation der Zellen, wie Schusser et al. an JH-KO Tieren zeigten [1]. Nach Ausschluss dieser Faktoren wäre es möglich, dass der Prozess des Gen-Rearrangements ein auslösendes Signal für die Wanderung und die Proliferation der B-Zellen ist [21]. Durch die bisherigen Versuche von Schusser et al. wurde jeweils eine

Immunglobulinkette entfernt [1, 2]. Bei IgL-KO Tieren verbleibt aber weiterhin das Rearrangement der schweren Ketten im Tier und bei JH-KO Tieren rearrangiert der Genlokus der leichten Kette. Um beide Rearrangements auszuschalten, wurden die beiden Modifikationen in dieser Arbeit kombiniert. Die mögliche Problematik durch das Verbleiben des V_H und der D_H-Segmente in den JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren ist unter 6.1.2 detailliert diskutiert.

Durch die Histologie der Bursa an ET18 konnte nachgewiesen werden, dass auch in JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren weiterhin B-Zellen in die Bursa einwandern und proliferieren (siehe Abb. 13). Die Kombination des Knockouts des J_H-Segments mit dem Knockout der leichten Kette verhinderte die Migration der Zellen folglich nicht. Eine genaue Quantifizierung oder Vermessung der B-Zell Follikel in der Bursa anhand der histologischen Schnitte wurde nicht vorgenommen, da die These, dass das Rearrangement ausschlaggebend für die Migration der B-Zellen sei, unabhängig von der Anzahl der eingewanderten Zellen abgelehnt werden konnte.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse des Blutes auf B-Zellen durch eine Färbung des Bu1-Antigens am 14. Lebenstag konnten in JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren keine B-Zellen detektiert werden. Bei IgL^{-/-} Tieren ist ein sehr geringer Prozentsatz an Zellen in der Lage, aus der Bursa auszuwandern, wohingegen in JH^{-/-} Tieren keine peripheren B-Zellen detektierbar sind. (siehe 2.2.3). Analog zu den JH^{-/-} Tieren, sind auch in JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren keine ausgewanderten B-Zellen im Blut zu detektieren. Da die JH^{-/-} IgL^{-/-} Tiere genetisch auch homozygot für den Knockout des J_H-Segments veranlagt sind, ist diese Beobachtung naheliegend. Ebenso verhält es sich für die Separation der Follikel: In IgL^{-/-} Tieren kommt es weiterhin zur Separation der Follikel in Rinden- und Markbereich – in diesen Tieren ist aber weiterhin die schwere Immunglobulinkette vorhanden. Beim Knockout der schweren Kette fehlt die Separierung, obwohl die leichte Kette noch exprimiert wird. Da in JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren ebenfalls die schwere Kette fehlt, ist es plausibel, dass es zu keiner Separierung der Follikel kommt. Es ist also wahrscheinlich, dass die Expression des sIgs nötig ist, damit die B-Zellen aus dem Markbereich über die Basement-Membran in den Rindenbereich migrieren können [1].

6.1.2. Verbleib des V_H zu D_H Rearrangements in JH-KO Tieren

Zur Modifikation der PGCs im Zuge der Generierung der JH-KO Tiere verwendeten Schusser et al. die homologe Rekombination [1]. Durch den Targeting-Vektor wurde das J_H-Segment der schweren Kette entfernt, aber das D_H- und die V_H-Segmente verblieben im Genom. Da das J_H-Segment im Genom des Huhnes zwischen den Segmenten der variablen und der konstanten Region der schweren Kette liegt, kann in JH-KO Tieren kein BCR und auch keine funktionalen Antikörper ausgebildet werden. Diese Aussage wird nicht nur durch fehlende Antikörpertiter für IgM und IgY im ELISA gestützt, sondern auch durch die fehlende C μ -Expression in JH^{-/-} Tieren [1]. Wie bereits erwähnt, verbleiben aber das D_H- und das V_H-Segment im Tier, die prinzipiell immer noch in der Lage wären zu rearrangieren. Beim Prozess des Gen-Rearrangements des Huhns werden zuerst ein zufällig gewähltes D_H und das einzige J_H-Segment zusammengefügt, Danach erfolgt das V_H zu DJ_H Rearrangement [8, 13]. Wenn das J_H-Segment fehlt, wird zwar schon das D_H zu J_H Rearrangement verhindert, aber es wäre trotzdem möglich, dass sich V_H- und D_H-Segment zusammenlagern. Da das V_H-Segment das erste Segment der variablen Region der Immunglobuline ist, ist in diesem auch ein Startcodon konfiguriert. Es wäre also zusätzlich möglich, dass durch das Startcodon des VD_H-Rearrangement ein Teil der variablen Region JH-KO Tieren transkribiert wird. Um das verbleibende VD_H-Rearrangement zu eliminieren, wäre die Generierung von Tieren mit einem kompletten VDJ-Knockout nötig. Ching et al. beschreiben die Generierung von Tieren mit einem Knockout des V_H und des V_J-Segments. Die Immunglobulinloki dieser Tiere wurden weiter modifiziert, um humane Antikörper zu produzieren. Diese Tiere wären sehr gut geeignet, um die Bedeutung des Gen-Rearrangements auf die B-Zell-Entwicklung zu untersuchen [120].

Beim IgL-KO konnten alle codierenden Exons des V_L, J_L und C_L Segments entfernt und durch eine selektierbare Markerkassette ersetzt werden, die die gleiche Konfiguration wie beim JH-KO hatte. Durch ein Cre-Rekombinase Konstrukt wurden in den PGCs des IgL-KOs zusätzlich das eGFP-Gen und die Puromycinresistenz entfernt und anschließend genetisch modifizierte Tiere generiert [2].

Die Kombination von JH-KO und IgL-KO ist folglich eine sehr gut geeignete Methode, um das Gen-Rearrangement im Huhn zu inhibieren. Es wäre trotzdem

möglich, dass in JH^{-/-} IgL^{-/-} Tieren ein V_H zu D_H Rearrangement stattfindet (unveröffentlichte Daten), obwohl das vorhergehende D_H zu J_H Rearrangement nicht erfolgen konnte.

6.1.3. Etablierung des B-Zell Sorts als Voraussetzung für die RNA-Sequenzierung der embryonalen Zellen

Um auslösende Faktoren für die Wanderung und Proliferation der B-Zellen in der Bursa identifizieren zu können, wurde in dieser Arbeit der B-Zell Sort aus embryonalem Gewebe etabliert. Diese Anreicherung der Zellen muss sehr effizient sein, da B-Zellen in den meisten Geweben an ET12 weniger als 1 % der Zellen ausmachen [3]. Die Anreicherung der B-Zellen durch Verwendung eines FACS-Sorters wäre möglich, ist aber aufgrund des hohen Zeitaufwands ineffizient. Bei Versuchen mit magnetischen Verfahren war der MACS Zellsort der Firma Miltenyi mit möglichst großen Poolgrößen die erfolgreichste Methode. Die Markierung der Zellen erfolgte dabei über das Bu1-Antigen, das schon ab ET8 stabil auf den B-Zellen exprimiert wird (siehe 2.1.2).

Nach der Etablierung der Methode sollen im weiteren Verlauf B-Zellen isoliert aus Blut, Milz und Bursa an ET12 per RNA-Seq verglichen werden. Dadurch können die Expressionslevel der verschiedenen Gene verglichen werden und so mögliche Faktoren für die Wanderung und die Proliferation identifiziert werden [121]. Eine Methode zu Analyse der Genexpression war früher die Verwendung von Microarrays. Dabei werden kurze DNA-Fragmente als Sonden verwendet, um die Menge an mRNA für das fragliche Gen bestimmen zu können. Bei Versuchen von Schmieder et al., die die Expressionsmuster der Bursa während verschiedener Zeitpunkte der B-Zell Entwicklung untersuchten, konnte z.B. ein interessantes Expressionsmuster von Interleukin 7 (IL-7) gefunden werden [122]. IL-7 ist ein Zytokin, das im Mensch die B-Zell Reifung und Proliferation stimuliert [123]. Allerdings wurde die Microarray-Technologie inzwischen durch das RNA-Seq abgelöst. Bei dieser Technik aus dem Bereich des Next-Generation-Sequencings wird die vorhandene RNA in cDNA umgeschrieben und in kurze Fragmente geteilt. Diese werden dann einzeln sequenziert, im Anschluss zusammengesetzt und gegen ein Referenzgenom kartiert [124, 125]. Die RNA-Seq Technologie ist derzeit der aktuellste Stand der Technik. Sie ist schneller, kostengünstiger und aussagekräftiger

als z.B. die Microarray-Technologie [124, 125].

Der Fokus bei der Identifikation möglicher Faktoren für das Auslösen der B-Zell-Migration soll hypothesengetrieben auf Selektine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle gelegt werden. Des Weiteren gilt beispielsweise der Appendix des Kaninchens in dessen B-Zell Entwicklung als Homolog zur Bursa des Vogels, sodass auch hier mögliche Kandidatengene wie CCR7 aufgegriffen werden könnten [126]. Da aber die Gattung der Vögel wenig phylogenetische Verwandtschaft mit gut-charakterisierten Spezies wie z.B. Mensch oder Maus aufweist und zudem im Vogel noch nicht alle Gene identifiziert worden sind, muss auch eine nicht-hypothesengetriebene Vorgehensweise bedacht werden [127].

6.2. Vergleich von Küken ohne maternale Antikörper zu Küken mit maternalen Antikörpern

6.2.1. Bestmögliche Voraussetzung zur Deletion der maternalen Antikörper durch JH-KO Tiere

Zur Generierung von Küken ohne maternale Antikörper sind Hennen ohne Antikörper nötig. In der Forschung zur B-Zell Entwicklung im Huhn gab es bereits vielfältige Ansätze zur B-Zell Deletion: Als Bruce Glick 1956 die Bursa als das Antikörper produzierende Organ der Vögel beschrieb, erwähnte er gleichzeitig die erste Methode zur Deletion der B-Zellen. Diese basierte auf der physischen Ablation der Bursa (Bursektomie) [128-130]. Glick beschrieb wiederum 1961 die Behandlung der Embryonen mit Testosteronpropionat, wodurch die Tiere zwar B-Zellen aufweisen, aber zu keiner primären oder sekundären Immunantwort fähig sind [34]. Eine weitere Methode ist die Bestrahlung der Bursa [131] oder die Verwendung von Cyclophosphamiden, wodurch der lymphoide Anteil der Bursafollikel und somit vorrangig die B-Zellen zerstört werden [132]. Ratcliffe et al. beschrieben 1979 die Allotypsuppression, bei der Antikörper gegen die konstante Region der Antikörper in Embryonen injiziert werden [133].

Wie bereits unter 2.2.3 beschrieben, konnten 2013 durch genetische Modifikation JH-KO Hühner generiert werden, denen periphere B-Zellen und damit funktionale Antikörper fehlen. [1]. Aufgrund dieser Eigenschaft sind JH^{-/-} Tiere sehr gut als maternale Generation für Versuchstiere ohne maternale Antikörper geeignet. In der Anpaarung der Gruppen wurde darüber hinaus berücksichtigt, dass Versuchs- und

Kontrollgruppe den gleichen Genotyp haben und zu exakt gleichen Bedingungen aufgezogen und behandelt worden sind (siehe Tabelle 15). Die Tiere beider Gruppen sind heterozygot für den JH-KO. $JH^{+/-}$ Tiere zeigen in ihrer Charakterisierung kaum Unterschiede zu WT Tieren, da sie ein verbliebenes funktionales WT Allel haben (vgl. Schusser et al. [1]). Es wäre aber möglich, dass beispielsweise durch das fehlende Allel ein Unterschied im Antikörperrepertoire zwischen $JH^{+/-}$ und WT Tieren vorliegt. Dadurch könnten die hier erarbeiteten Ergebnisse im Vergleich zu WT Tieren verzerrt worden sein. Die hier getroffenen Aussagen treffen daher für Tiere mit und ohne maternale Antikörper auf dem genetischen Hintergrund des heterozygoten JH-KO zu, aber eine Aussage über Hühner im Allgemeinen muss – vor allem in Bezug auf das Antikörperrepertoire und dessen Diversifizierung – vorsichtig getroffen werden.

Allerdings sind alle Versuchstiere mit und ohne maternale Antikörper durch das verbliebene WT-Allel in der Lage, selbstständig funktionale Antikörper zu bilden. Die Versuchs- und die Kontrollgruppe unterscheiden sich nur durch das Fehlen bzw. Vorhandensein der maternalen Antikörper voneinander. Alle Tiere des Versuchs unterscheiden sich aber von WT Tieren durch das Fehlen eines Allels. Durch die Wahl von Tieren mit genetischer Modifikation als maternale Generation wurden die derzeit bestmöglichen Bedingungen geschaffen, die Auswirkungen der maternalen Antikörper auf die Ausbildung einer Immunantwort aber auch auf allgemeine Parameter wie Körpergewicht und PBMC-Zusammensetzung, zu untersuchen.

6.2.2. Nachweis des Fehlens der maternalen Antikörper in der Versuchsgruppe

Um zu bestätigen, dass keine maternalen Antikörper von den $JH^{-/-}$ Hennen übertragen werden können, wurde per ELISA bestätigt, dass im Blutplasma dieser Tiere keine IgM, IgY und IgA Antikörper detektierbar sind. Als nächster Schritt wurde bestätigt, dass im Dotter der Eier von $JH^{-/-}$ Hennen ebenfalls kein maternales IgY nachweisbar ist. Die in dieser Arbeit gemessenen Menge an IgY in Dottern von WT Hennen liegt im Mittel bei 5,4 mg/ml (siehe Abb. 17). In den Dottern von $JH^{-/-}$ Hennen konnte wie erwartet kein IgY nachgewiesen werden. Studien zum IgY Gehalt im Dotter WT Hennen geben Werte von 20-25 mg/ml [55], 7,9 mg/ml [90] und 10 mg/ml [134] an. Die Zahlen variieren dabei je nach Messverfahren. So kann der in dieser Arbeit gemessene Wert von 5,4 mg/ml in den Dottern der WT Hennen

als realistisch angesehen werden.

Wie von Kowalczyk et al. beschrieben, ist der größte Anteil der maternalen Antikörper vom Isotyp IgY und von diesen werden maximale Werte von 1-5 mg/ml am 2. Lebenstag des Kükens gemessen [90]. In dieser Arbeit liegt der Mittelwert an maternalen IgY Antikörpern in der Kontrollgruppe am 3. Lebenstag bei 2,2 mg/ml. Die endogene Synthese von IgY Antikörpern des Kükens beginnt laut Kaspers et al. ab dem 10. Lebenstag (siehe Abb. 7) [118]. Diese Beobachtung ist mit den Ergebnissen dieser Arbeit konform, da am 14. Lebenstag erste IgY Antikörper in den Tieren ohne maternale Antikörper nachgewiesen werden konnten, wohingegen am 7. Lebenstag in der Versuchsgruppe noch kein IgY detektierbar war (siehe Abb. 28).

IgM und IgA Antikörper werden nur zu einem sehr geringen Anteil als maternale Antikörper übertragen. Rose et al. berichten Werte an maternalen Antikörpern von 0,15 mg/ml für IgM und 0,7 mg/ml für IgA [55]. Kaspers et al. zeigen wesentlich niedrigere Werte an übertragenen maternalen Antikörpern (siehe Abb. 7) [118] und auch die in dieser Arbeit beobachteten Werte für IgM und IgA liegen nur bei 0,04 mg/ml bzw. 0,02 µg/ml.

Trotz dieser geringen Menge an übertragenen maternalen Antikörpern ist sowohl für IgM als auch für IgA am 3. Lebenstag signifikant weniger Immunglobulin in der Versuchsgruppe ohne maternale Antikörper als in der Kontrollgruppe nachweisbar (siehe Abb. 26, Abb. 30). Dieser signifikante Unterschied setzt sich je nach Gruppierung der Versuchstiere an Tag 7 fort.

6.2.3. Das Fehlen von maternalen Antikörpern führt zu höheren IgM sowie niedrigeren IgY Titern

Ab Tag 14 gleichen sich die Titer der Versuchs- und Kontrollgruppe an. Die Tiere der Versuchsgruppe sind also in der Lage, durch ihre eigene Antikörperproduktion innerhalb von drei Lebenswochen zur Kontrollgruppe aufzuholen. Bei den Antikörpern vom IgM Isotyp hat die Versuchsgruppe leicht höhere Werte als die Kontrollgruppe. Dies könnte bedeuten, dass diese Tiere stärker auf den ersten Kontakt mit Antigenen reagieren. Wie später unter 6.2.5 diskutiert, wäre es möglich, dass die maternalen Antikörper das Immunsystem des Jungtieres unterstützen. Tiere ohne maternale Antikörper durchlaufen dagegen vermehrt Immunreaktionen. Die erhöhten IgM-Antikörpertiter in der Versuchsgruppe

würden diese Theorie unterstützen.

Der Titer für die Antikörper vom Isotyp IgY ist dagegen in der Versuchsgruppe kontinuierlich niedriger als in der Kontrollgruppe. Diese Beobachtung korrespondiert mit den Versuchen von Kaspers et al., bei denen die IgY-Titer in agammaglobulinämischen Tieren konsistent niedriger sind als in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 7) [118]. Da IgY Antikörper erst nach dem Immunglobulinklassenwechsel entstehen, muss diese Beobachtung nicht in Kontrast zu der erwähnten Theorie der Unterstützung des Immunsystems stehen.

Für IgA sind die gemessenen Titer im Blutplasma mit ca. 25 µg/ml sehr niedrig und die Werte der Regressionsrechnung schwanken stark (siehe Abb. 30). Die absoluten Serumwerte für die Immunglobuline wurden per Regressionsanalyse errechnet. Da aber dabei mit der Verdünnungsstufe multipliziert werden muss, können sich kleine Unterschiede zwischen den Versuchstieren groß auswirken. Diese Schwankungen waren vor allem bei IgA groß, da die hier gemessenen Serumwerte nur ca. $\frac{1}{100}$ der Werte von IgM und IgY waren. Um möglichst vergleichbare Werte zu erhalten, wurde die Regressionsgerade immer durch den Wert der 3. bis 5. Verdünnungsstufe definiert und $R^2 \geq 0,95$ festgelegt. Der für das Diagramm verwendete Wert, war immer der bei der 4. Verdünnungsstufe errechnete Wert.

In der Literatur werden IgA Titer im Serum erwachsener Tiere von 0,3 mg/ml [135], in der Cäcaltonsille 15 µg/ml [136] und in der Galle 3,15 mg/ml [135] gemessen. Leider war in dieser Arbeit die Messung von IgA in der Galle aufgrund von hohem Hintergrundsignal nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Um die Menge an IgA in der Cäcaltonsille zwischen Tieren mit und ohne maternalen Antikörpern vergleichen zu können, wurde die Expression mittels qPCR gemessen. Dabei zeigt sich, dass die Expression von IgA von Tieren ohne maternale Antikörper dem Wert von Tieren mit maternalen Antikörpern sehr ähnlich ist (siehe Abb. 31). Die Ergebnisse der IgA Titer im Blut und der IgA Expression in der Cäcaltonsille weisen darauf hin, dass es für diesen Isotyp kaum Unterschiede zwischen Tieren mit und ohne maternale Antikörper gibt.

Zusammengefasst fehlen den Tieren der Versuchsgruppe zwar maternale Antikörper, aber sie sind in vergleichbarem Maße wie Tiere mit maternalen Antikörpern in der Lage eigene Antikörper zu bilden. Die Menge an gebildeten Antikörpern ist für den Isotyp IgM höher als in der Kontrollgruppe und für den

Isotyp IgY niedriger als in der Kontrollgruppe. Um die Auswirkungen der maternalen Antikörper auf die Entwicklung der Immunantwort weiter zu untersuchen, wurden die Tiere mit einem Modellanitgen immunisiert.

6.2.4. Keine Beeinträchtigung der Ausbildung der Immunantwort auf KLH durch maternale Antikörper

Natürliche Antikörper sind Antikörper, die im Tier präsent sind, ohne dass eine Exposition mit dem Antigen erfolgt ist [82]. Es wird vermutet, dass natürliche Antikörper neben den maternalen Antikörpern dazu beitragen, das Küken vor Pathogenen zu schützen [137]. Darüber hinaus wird vermutet, dass hohe Titer an natürlichen Antikörpern gegen KLH mit einer höheren Überlebensrate assoziiert sind [138] und KLH wurde als potentieller Marker für eine Zuchtstrategie anhand natürlicher Antikörper identifiziert [137]. In dieser Arbeit konnten vor der Immunisierung keine Titer für KLH-spezifische Antikörper gemessen werden (siehe Abb. 32). Da die Tiere zusätzlich erst am 35. Lebenstag mit KLH immunisiert wurden, ist nicht anzunehmen, dass natürliche Antikörper gegen KLH die Immunantwort beeinflusst haben. Andersherum könnten die natürlichen Antikörper in den Versuchstieren einen Einfluss auf die Ausbildung der Immunantwort gehabt haben [82]. Grundsätzlich wird KLH aus der Hämolymphe der Schlitzschnecke gewonnen und in der Immunologie häufig z. B. als Trägerprotein für niedermolekulare Strukturen verwendet [139]. Da aber durch die natürlichen Antikörper vor allem die Immunreaktion auf körpereigene Antigene verhindert werden soll, ist es nicht wahrscheinlich, dass die natürlichen Antikörper einen Einfluss auf die Immunantwort nach der Immunisierung mit KLH haben [83].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere zur Messung der Immunantwort am 35. Lebenstag mit KLH immunisiert und am 56. Lebenstag erfolgte ein Boost. An D7, D21 und D35 p.i. wurden die anti-KLH spezifischen IgM/IgY Titer gemessen und zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe verglichen. Die Titer beider Gruppen sind an allen Tagen sehr ähnlich (siehe Abb. 33, Abb. 34). Eine Quantifizierung der gebildeten Antikörper war in Ermangelung eines anti-KLH Standards leider nicht möglich.

Während für die isotypspezifischen Antikörpertiter im Blut teilweise Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe zu sehen waren, reagieren beide Gruppen gleich auf die Stimulation des Immunsystems mit einem Antigen. Die Ausbildung

einer Immunantwort scheint also durch das Fehlen von maternalen Antikörpern nicht beeinträchtigt zu sein.

6.2.5. Erhöhter Energieverbrauch für Immunantworten bei Tieren ohne maternale Antikörper

Aus evolutionärer Sicht ist es sinnvoll, dass die Elterngeneration dem Nachwuchs den bestmöglichen Start ins Leben ermöglicht. Ein Mechanismus ist dabei die Übertragung von maternalen Antikörpern, die den Nachwuchs in den ersten Lebenswochen vor Infektionen schützen sollen. Andere Beispiele wären in der Maus z.B. der Transforming growth factor β und Interleukin-10, die durch die Milch übertragen werden, um die Reaktion des Jungtieres auf die Bakterien des Mikrobioms zu begrenzen [140, 141]. Auch die maternale Mikrobiota während der Trächtigkeit hat Einflüsse auf das Jungtier. So konnte gezeigt werden, dass der Nachwuchs von keimfrei gehaltenen Mäusen einen höheren Stoffwechsel hat als Nachwuchs von SPF-Tieren [142]. Im Zusammenhang mit maternalen Antikörpern beschreiben z.B. Koch et al., dass diese dazu beitragen, die T-Helfer-Zell gesteuerte Immunantwort auf den Kontakt mit der Mikrobiota zu dämpfen (siehe 2.3.4) [114]. Diese Mechanismen könnten darauf hindeuten, dass die Elterngeneration dem Nachwuchs Energie für unnötig durchlaufene Immunantworten sparen will [4]. Dies würde einen evolutionären Vorteil für das Jungtier bedeuten und so die Fitness erhöhen.

Diese Argumentation wird auch von den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen hinsichtlich des Körpergewichts unterstützt. Tiere ohne maternale Antikörper zeigen über den gesamten Versuchszeitraum ein signifikant geringeres Gewicht als Tiere mit maternalen Antikörpern. Nach dieser Theorie würden durch das Fehlen der Antikörper die Mechanismen zur Unterstützung des Immunsystems entfallen und die Tiere brauchen vermehrt Energie, um Immunantworten zu durchlaufen.

6.2.6. Maternal Antikörper negative Tiere zeigen verminderte T-Zell-Zahlen im Blut

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Zellpopulationen der PMBCs sind die relativen Werte an B-Zellen an beiden Versuchstagen in allen Versuchstieren ähnlich hoch. Da alle Versuchstiere denselben JH^{+/-} Genotyp haben, ist dies plausibel. Die Mittelwerte der α/β T-Zellen sind an Tag 14 in den Tieren ohne maternale Antikörper signifikant niedriger. An Tag 63 sind die Prozentsätze beider

Versuchsgruppen bezogen auf diese Zellpopulation nicht signifikant verschieden. Für die γ/δ T-Zellen hingegen ist an beiden Versuchstagen der Mittelwert der relativen Werte in den Tieren ohne maternale Antikörper zu einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ niedriger. Da aber im Versuchsaufbau keine Quantifizierung der Zellen enthalten war, kann über die absolute Menge an α/β bzw. γ/δ T-Zellen keine Aussage gemacht werden. Es wäre sinnvoll, diese Unterschiede in der PBMC-Zusammensetzung in weiterführenden Versuchen zu analysieren.

6.2.7. Zusammenfassung der Erkenntnisse von Küken ohne maternale Antikörper

Grundlegend fehlt Küken ohne maternale Antikörper der Schutz des erworbenen Immunsystems vor diversen Pathogenen in den ersten drei Lebenswochen. Ab der dritten Lebenswoche haben die Tiere ohne maternale Antikörper zu den Immunglobulinspiegeln von Tieren mit maternalen Antikörpern aufgeholt. Allerdings haben Küken ohne maternale Antikörper tendenziell höhere IgM-Titer über die Zeit. Das könnte ein Hinweis sein, dass sie vermehrt Immunreaktionen durchlaufen, da die unterstützende Wirkung der maternalen Antikörper fehlt. Die IgY-Titer der Tiere ohne maternale Antikörper sind dabei niedriger als in Tieren mit maternalen Antikörpern. Auf eine Stimulation mit einem Antigen fällt dagegen sowohl der spezifische IgM als auch der spezifische IgY Titer in Tieren mit und ohne maternale Antikörper gleich aus. Es gibt also keinen Hinweis, dass Küken ohne maternale Antikörper weniger immunkompetent wären. Sehr deutlich ist allerdings, dass das Fehlen der maternalen Antikörper sich auf die körperliche Verfassung auszuwirken scheint. Küken ohne maternale Antikörper wiegen signifikant weniger als Küken mit maternalen Antikörper. Es wäre möglich, dass maternale Antikörper helfen, dem Nachwuchs Energie zu sparen, indem sie das Immunsystem unterstützen.

6.3. Notwendige Prozessierung der Daten zum Antikörperrepertoire nach erfolgreicher Qualitätskontrolle

FastQC ist ein Programm zur Qualitätskontrolle von Next-Generation-Sequencing Daten [143]. Die Qualität jeder Base der Sequenz gibt dabei einen Score von 0-38 an. Der Score sollte für die Auswertung der Daten bei einem Wert von < 20 liegen.

Das ist für alle sequenzierten Proben der Fall, wobei die Proben von Eurofins eine wesentlich höhere Standardabweichung für die einzelnen Basenpositionen haben. Die Qualität der Sequenzen im Mittel stellt eine Übersicht der Qualität aller Sequenzen dar. Auch hier gilt ein Score von < 20 als erforderlich [143]. Alle analysierten Proben erfüllen diesen Score, aber die Proben von Eurofins zeigen ein gehäuftes Auftreten von Sequenzen mit einer Qualität von 20-24. Diese Sequenzen sollten bei einer Analyse der Daten durch einen Filter entfernt werden [143]. Für den Basengehalt der Sequenz wären parallele Linien auf ungefähr gleicher Höhe wünschenswert, was in den analysierten Daten leider nicht zu sehen ist [143]. Des Weiteren ist für alle drei Proben der Basengehalt an Guanin und Cytosin hoch. Auch in der Analyse des GC-Gehalt der Probe liegt der Wert an Guanin und Cytosin etwas höher als theoretisch anhand der gemessenen Daten errechnet. Ein höherer Gehalt an GC-Nukleotiden könnte durch die Adapter verursacht werden und würde durch das Trimmen der Adapter gelöst werden [143]. Das Duplikationslevel ist bei den analysierten Proben sehr hoch, hier muss eine Deduplikation in Betracht gezogen werden [143].

Im weiteren Verlauf sollten die Daten daher getrimmt werden, um die Adapter vor der Analyse zu entfernen sowie Sequenzen mit einem schlechten Qualitätsscore auszuschließen. Eine erste Analyse der Daten mit IMGT/HiVQuest wurde durchgeführt, aber die Auswertung ist nicht in diese Arbeit inkludiert, da es sich zum Zeitpunkt der Abgabe der Arbeit noch um vorläufige Auswertungen gehandelt hat [144, 145]. Des Weiteren erfolgt derzeit die Entwicklung eines für das Huhn geeigneten Analysetools in Kooperation mit der TUM Core Facility für Bioinformatik/Lehrstuhl für Bioinformatik.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Geflügel und insbesondere das Huhn stellt weltweit eine der wichtigsten Nutztierarten dar. Hähnchenfleisch und Eier sind heutzutage wichtige Bestandteile der menschlichen Ernährung. Gleichzeitig gibt es sehr viele Krankheitserreger, die die Geflügelbestände bedrohen. Neben Hygienemaßnahmen sind Impfungen die am häufigsten verwendete Methode, um die Tierbestände präventiv zu schützen. Die meisten Impfungen erfolgen dabei um den Zeitpunkt des Schlupfes, wenn noch sehr viele maternale Antikörper – insbesondere IgY-Antikörper – im Blut des Jungtieres zirkulieren. Bisherige Ansätze zur Generation von Küken ohne maternale Antikörper – oder grundlegender – zur B-Zell Deletion waren entweder die Bursektomie oder die Behandlung mit Testosteron. Beide Methoden sind jedoch ineffizient und haben starke Auswirkungen auf die Tiergesundheit. Aufgrund dieser Komplikationen gibt es bisher sehr wenig Daten zu Hühnern ohne maternale Antikörper.

Durch die Kultivierung von primordialen Keimzellen und die Etablierung der Methoden zur genetischen Modifikation von Hühnern konnten jüngst Tiere ohne periphere B-Zellen erzeugt werden. Aufgrund dieser Modifikation fehlen diesen Tieren funktionale Antikörper. Diese Arbeit untersucht die Rolle der maternalen Antikörper auf die Entwicklung einer Immunantwort, insbesondere der erworbenen Immunantwort. Dabei konnte festgestellt werden, dass Tiere ohne maternale Antikörper kaum Unterschiede im Vergleich zu Tieren mit maternalen Antikörpern in der Produktion der Immunglobuline und der Reaktion auf die Stimulation mit einem Antigen zeigen. Allerdings waren die Tiere ohne maternale Antikörper in der Entwicklung ihres Körpergewichts signifikant leichter über den gesamten Versuchszeitraum als die Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die maternalen Antikörper nicht nur das Jungtier vor Krankheiten schützen, sondern auch Einfluss auf dessen körperliche Konstitution haben.

Darüber hinaus wurden die B-Zell Knockout Hühner verwendet, um die Bedeutung des Gen-Rearrangements im Zuge der Immunglobulinbildung für die Migration der B-Zellen in die Bursa zu analysieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Gen-Rearrangement nicht das auslösende Signal für die Wanderung der B-Zellen in die Bursa ist und damit nicht im prognostizierten Maße für die B-Zell Entwicklung

relevant ist. In den Versuchen mit Küken ohne maternale Antikörper zeigten diese eine reduzierte Gewichtsentwicklung bei vergleichbarer Immunkompetenz. Die Hypothese des zusätzlichen Energieverbrauchs durch vermehrte Immunreaktionen beim Fehlen maternalen Antikörper muss in weiteren Versuchen genauer untersucht werden.

8. SUMMARY

Poultry and especially chicken represent one of the most important livestock species worldwide. Protein derived from poultry is nowadays an essential component of the human diet. At the same time poultry flocks are threatened by a wide range of pathogens. Apart from biosecurity measures, vaccination is the most used method to protect poultry flocks. Most vaccinations are used around the time of hatch when a large amount of maternal antibodies especially IgY are circulating in the young chick. Previous approaches to remove B cells and derive offspring without maternal antibodies have been bursectomy or treatment with testosterone. Since these technologies are leaky and not very efficient only very limited data is available.

With the availability of primordial germ cell cultures and the development of gene knockout chickens, birds without peripheral B cells have been generated. These birds completely lack antibodies. In this study the role of maternal antibodies on the development of the immune response especially the adaptive immune response was analyzed. Chicken lacking maternal antibodies were in the same way able to produce immunoglobulin and to respond to a stimulation with an antigen than animals with maternal antibodies. However, the group without maternal antibodies had significantly lower body weight than the control group. These results suggest that maternal antibodies not only protect the chick from diseases, but also influence its physical constitution.

Moreover, the B cell knockout chicken were used to analyze the importance of the gene rearrangement during the formation of immunoglobulins in the early B cell development. It could be shown that gene rearrangement is not the triggering signal for the migration of B cells into the bursa. Thus, the gene rearrangement is for the B cell migration not relevant to the predicted extend. Concluding, the experiments with chicks without maternal antibodies showed a reduced weight development, but at the same time comparable immunocompetence in comparison to chicks with maternal antibodies. The hypothesis of additional energy consumption due to increased immune responses in animals lacking maternal antibodies needs to be further investigated.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Schusser, B., et al., *Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(50): p. 20170-5.
2. Schusser, B., et al., *Expression of heavy chain-only antibodies can support B-cell development in light chain knockout chickens*. Eur J Immunol, 2016. **46**(9): p. 2137-48.
3. Laparidou, M., *Analysis of the early B cell development in the domestic chicken by reverse genetics*, in *Veterinärwissenschaftliches Department*, 2017, Ludwig-Maximilians-Universität München.
4. Niewiesk, S., *Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 446.
5. Gharaibeh, S. and K. Mahmoud, *Decay of maternal antibodies in broiler chickens*. Poult Sci, 2013. **92**(9): p. 2333-6.
6. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology*. 8th ed. 2012, New York: Garland Science. xix, 868 p.
7. Paul, W.E., *Fundamental immunology*. 2013, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. xviii, 1283 p.
8. Schat, K.A., B. Kaspers, and P. Kaiser, *Avian immunology*. 2014, Elsevier : Academic Press: Amsterdam ; Boston. p. 46-63.
9. Salomon, F., Geyer, H., Gille U., *Anatomie für die Tiermedizin*. 2008, Enke.
10. Schat, K.A., B. Kaspers, and P. Kaiser, *Avian immunology*. Second edition. ed. 2014, Amsterdam ; Boston: Elsevier : Academic Press. xvi, 439 pages.
11. Dieterlen-Lievre, F. and C. Martin, *Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development*. Dev Biol, 1981. **88**(1): p. 180-91.
12. Le Douarin, N.M., *Ontogeny of the peripheral nervous system from the neural crest and the placodes. A developmental model studied on the basis of the quail-chick chimera system*. Harvey Lect, 1984. **80**: p. 137-86.
13. Ratcliffe, M.J. and K.A. Jacobsen, *Rearrangement of immunoglobulin genes in chicken B cell development*. Semin Immunol, 1994. **6**(3): p. 175-84.
14. McCormack, W.T., et al., *Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development*. Genes Dev, 1989. **3**(6): p. 838-47.
15. Ratcliffe, M.J., et al., *Avian B cell precursors: surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event*. Eur J Immunol, 1986. **16**(2): p. 129-33.

16. Houssaint, E., A. Mansikka, and O. Vainio, *Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo*. J Exp Med, 1991. **174**(2): p. 397-406.
17. Olah, I., B. Glick, and I. Toro, *Bursal development in normal and testosterone-treated chick embryos*. Poult Sci, 1986. **65**(3): p. 574-88.
18. Olah, I. and B. Glick, *The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius*. Poult Sci, 1978. **57**(5): p. 1445-50.
19. Houssaint, E., M. Belo, and N.M. Le Douarin, *Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras*. Dev Biol, 1976. **53**(2): p. 250-64.
20. Aliahmad, P., K.A. Pike, and M.J. Ratcliffe, *Cell surface immunoglobulin regulated checkpoints in chicken B cell development*. Vet Immunol Immunopathol, 2005. **108**(1-2): p. 3-9.
21. Ratcliffe, M.J., *Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 101-18.
22. Masteller, E.L., et al., *Avian B cell development*. Int Rev Immunol, 1997. **15**(3-4): p. 185-206.
23. Sinha, R.K., C. Alexander, and R.G. Mage, *Regulated expression of peripheral node addressin-positive high endothelial venules controls seeding of B lymphocytes into developing neonatal rabbit appendix*. Vet Immunol Immunopathol, 2006. **110**(1-2): p. 97-108.
24. Laparidou, M., et al., *Blocking of the CXCR4-CXCL12 Interaction Inhibits the Migration of Chicken B Cells Into the Bursa of Fabricius*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 3057.
25. Masteller, E.L., et al., *Expression of sialyl Lewis(x) and Lewis(x) defines distinct stages of chicken B cell maturation*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5550-6.
26. Varki, A., *Selectin ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(16): p. 7390-7.
27. Masteller, E.L. and C.B. Thompson, *B cell development in the chicken*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 998-1011.
28. Le Douarin, N.M., et al., *Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(7): p. 2701-5.
29. Sayegh, C.E., et al., *The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development*. Immunol Rev, 2000. **175**: p. 187-200.
30. Arakawa, H., et al., *Effect of environmental antigens on the Ig diversification and the selection of productive V-J joints in the bursa*. J Immunol, 2002. **169**(2): p. 818-28.

31. Sanchez, M., et al., *Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta*. J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 1049-55.
32. Pike, K.A., et al., *The cytoplasmic domain of Ig alpha is necessary and sufficient to support efficient early B cell development*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2210-8.
33. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *B cell emigration directly from the cortex of lymphoid follicles in the bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1994. **24**(2): p. 458-63.
34. Glick, B., *The influence of dipping eggs in male hormone solutions on lymphatic tissue and antibody response of chickens*. Endocrinology, 1961. **69**: p. 984-5.
35. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood*. Eur J Immunol, 1993. **23**(1): p. 96-102.
36. Lassila, O., *Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1989. **19**(5): p. 955-8.
37. Sayegh, C.E. and M.J. Ratcliffe, *Perinatal deletion of B cells expressing surface Ig molecules that lack V(D)J-encoded determinants in the bursa of Fabricius is not due to intrafollicular competition*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5041-8.
38. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *Survivors of bursal B cell production and emigration*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 991-7.
39. Arakawa, H., et al., *Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers*. EMBO J, 1996. **15**(10): p. 2540-6.
40. Arakawa, H., et al., *Oligoclonal development of B cells bearing discrete Ig chains in chicken single germinal centers*. J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4232-41.
41. Jacob, J., et al., *In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells*. J Exp Med, 1993. **178**(4): p. 1293-307.
42. Arakawa, H., J. Hauschild, and J.M. Buerstedde, *Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion*. Science, 2002. **295**(5558): p. 1301-6.
43. Arakawa, H. and J.M. Buerstedde, *Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line*. Dev Dyn, 2004. **229**(3): p. 458-64.
44. Hainke, S., *Charakterisierung der germinalen Zentrumsreaktion beim huhn und deren Beeinflussung durch das Zytokin chBAFF*. Veterinärwissenschaftliches Department, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2011.

45. Schat, K.A., B. Kaspers, and P. Kaiser, *Avian immunology*. 2014, Elsevier : Academic Press: Amsterdam ; Boston. p. 65-88.
46. Zhao, Y., et al., *Mapping of the chicken immunoglobulin heavy-chain constant region gene locus reveals an inverted alpha gene upstream of a condensed epsilon gene*. Immunology, 2000. **101**(3): p. 348-53.
47. Leslie, G.A. and L.W. Clem, *Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken*. J Exp Med, 1969. **130**(6): p. 1337-52.
48. Mansikka, A., *Chicken IgA H chains. Implications concerning the evolution of H chain genes*. J Immunol, 1992. **149**(3): p. 855-61.
49. Warr, G.W., K.E. Magor, and D.A. Higgins, *IgY: clues to the origins of modern antibodies*. Immunol Today, 1995. **16**(8): p. 392-8.
50. Parvari, R., et al., *Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus*. EMBO J, 1988. **7**(3): p. 739-44.
51. Chen, C.L., J.E. Lehmeyer, and M.D. Cooper, *Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes*. J Immunol, 1982. **129**(6): p. 2580-5.
52. Han, B., et al., *Multiple IgH Isotypes Including IgD, Subclasses of IgM, and IgY Are Expressed in the Common Ancestors of Modern Birds*. J Immunol, 2016. **196**(12): p. 5138-47.
53. Stavnezer, J., *Immunoglobulin class switching*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(2): p. 199-205.
54. Muir, W.I., W.L. Bryden, and A.J. Husband, *Immunity, vaccination and the avian intestinal tract*. Dev Comp Immunol, 2000. **24**(2-3): p. 325-42.
55. Rose, M.E., E. Orlans, and N. Buttress, *Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white*. Eur J Immunol, 1974. **4**(7): p. 521-3.
56. Grant, J.A., B. Sanders, and L. Hood, *Partial amino acid sequences of chicken and turkey immunoglobulin light chains. Homology with mammalian lambda chains*. Biochemistry, 1971. **10**(16): p. 3123-32.
57. Reynaud, C.A., et al., *A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire*. Cell, 1987. **48**(3): p. 379-88.
58. Reynaud, C.A., et al., *A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity*. Cell, 1985. **40**(2): p. 283-91.
59. Thompson, C.B. and P.E. Neiman, *Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment*. Cell, 1987. **48**(3): p. 369-78.
60. Reynaud, C.A., et al., *Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region*. Cell, 1989. **59**(1): p. 171-

- 83.
61. Reynaud, C.A., V. Anquez, and J.C. Weill, *The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire*. Eur J Immunol, 1991. **21**(11): p. 2661-70.
62. Fanning, L.J., A.M. Connor, and G.E. Wu, *Development of the immunoglobulin repertoire*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **79**(1): p. 1-14.
63. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science. xxxiv, 1548 p.
64. McCormack, W.T. and C.B. Thompson, *Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light-chain gene*. Adv Immunol, 1990. **48**: p. 41-67.
65. Sayegh, C.E., G. Drury, and M.J. Ratcliffe, *Efficient antibody diversification by gene conversion in vivo in the absence of selection for V(D)J-encoded determinants*. EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6319-28.
66. Weinstein, P.D., A.O. Anderson, and R.G. Mage, *Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers: VH diversification by gene conversion-like and hypermutation mechanisms*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 647-59.
67. Meyer, A., et al., *Immunoglobulin gene diversification in cattle*. Int Rev Immunol, 1997. **15**(3-4): p. 165-83.
68. Reynaud, C.A., et al., *Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches*. Cell, 1991. **64**(5): p. 995-1005.
69. Butler, J.E., et al., *Antibody repertoire development in swine*. Dev Comp Immunol, 2006. **30**(1-2): p. 199-221.
70. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
71. Thomas, K.R. and M.R. Capecchi, *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells*. Cell, 1987. **51**(3): p. 503-12.
72. van de Lavoie, M.C., et al., *Germline transmission of genetically modified primordial germ cells*. Nature, 2006. **441**(7094): p. 766-9.
73. Fujimoto, T., T. Ninomyiya, and A. Ukeshima, *Observations of the primordial germ cells in blood samples from the chick embryo*. Dev Biol, 1976. **49**(1): p. 278-82.
74. Kim, J.N., et al., *Migration and proliferation of intact and genetically modified primordial germ cells and the generation of a transgenic chicken*. Biol Reprod, 2010. **82**(2): p. 257-62.
75. Flajnik, M.F., N. Deschacht, and S. Muyldermans, *A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels?* PLoS Biol, 2011. **9**(8): p. e1001120.

76. Epstein, J.H., et al., *Duration of Maternal Antibodies against Canine Distemper Virus and Hendra Virus in Pteropid Bats*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67584.
77. Tsutsui, T., et al., *Duration of maternally derived antibodies against Akabane virus in calves: survival analysis*. J Vet Med Sci, 2009. **71**(7): p. 913-8.
78. Palmeira, P., et al., *IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 985646.
79. von Engelhardt, W., *Physiologie der Haustiere*. 3. ed. 2010, Enke.
80. Casali, P. and A.L. Notkins, *CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire*. Immunol Today, 1989. **10**(11): p. 364-8.
81. Dacie, J.V., *Occurrences in normal human sera of 'incomplete' forms of 'cold' auto-antibodies*. Nature, 1950. **166**(4209): p. 36.
82. Thornton, B.P., V. Vetvicka, and G.D. Ross, *Natural antibody and complement-mediated antigen processing and presentation by B lymphocytes*. J Immunol, 1994. **152**(4): p. 1727-37.
83. Avrameas, S., *Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'*. Immunol Today, 1991. **12**(5): p. 154-9.
84. Costa-Carvalho, B.T., et al., *Transfer of IgG subclasses across placenta in term and preterm newborns*. Braz J Med Biol Res, 1996. **29**(2): p. 201-4.
85. Pollock, R.V. and L.E. Carmichael, *Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination*. J Am Vet Med Assoc, 1982. **180**(1): p. 37-42.
86. Winters, W.D., *Time dependent decreases of maternal canine virus antibodies in newborn pups*. Vet Rec, 1981. **108**(14): p. 295-9.
87. Casal, M.L., P.F. Jezyk, and U. Giger, *Transfer of colostral antibodies from queens to their kittens*. Am J Vet Res, 1996. **57**(11): p. 1653-8.
88. Bourne, F.J. and J. Curtis, *The transfer of immunoglobins IgG, IgA and IgM from serum to colostrum and milk in the sow*. Immunology, 1973. **24**(1): p. 157-62.
89. Hurley, W.L. and P.K. Theil, *Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk*. Nutrients, 2011. **3**(4): p. 442-74.
90. Kowalczyk, K., et al., *Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken*. Immunology, 1985. **54**(4): p. 755-62.
91. Losch, U., et al., *The chicken egg, an antibody source*. Zentralbl Veterinarmed B, 1986. **33**(8): p. 609-19.
92. Staley, T.E. and L.J. Bush, *Receptor mechanisms of the neonatal intestine and their relationship to immunoglobulin absorption and disease*. J Dairy Sci, 1985. **68**(1): p. 184-205.

93. Sangild, P.T., et al., *Intestinal macromolecule absorption in the fetal pig after infusion of colostrum in utero*. *Pediatr Res*, 1999. **45**(4 Pt 1): p. 595-602.
94. He, Y. and P.J. Bjorkman, *Structure of FcRY, an avian immunoglobulin receptor related to mammalian mannose receptors, and its complex with IgY*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(30): p. 12431-6.
95. Saif, L.J. and F.M. Fernandez, *Group A rotavirus veterinary vaccines*. *J Infect Dis*, 1996. **174 Suppl 1**: p. S98-106.
96. Westbury, H.A. and B. Sinkovic, *The pathogenesis of infectious avian encephalomyelitis. 1. The effect of the age of the chicken and the route of administration of the virus*. *Aust Vet J*, 1978. **54**(2): p. 68-71.
97. Li, X., et al., *Preparation and immunoprotection of subgroup B avian leukosis virus inactivated vaccine*. *Vaccine*, 2013. **31**(46): p. 5479-85.
98. Winkelstein, J.A., et al., *X-linked agammaglobulinemia: report on a United States registry of 201 patients*. *Medicine (Baltimore)*, 2006. **85**(4): p. 193-202.
99. Forrest, H.L., et al., *Effect of passive immunization on immunogenicity and protective efficacy of vaccination against a Mexican low-pathogenic avian H5N2 influenza virus*. *Influenza Other Respir Viruses*, 2013. **7**(6): p. 1194-201.
100. Naqi, S.A., B. Marquez, and N. Sahin, *Maternal antibody and its effect on infectious bursal disease immunization*. *Avian Dis*, 1983. **27**(3): p. 623-31.
101. Bruggemann, M. and K. Rajewsky, *Regulation of the antibody response against hapten-coupled erythrocytes by monoclonal anti-hapten antibodies of various isotypes*. *Cell Immunol*, 1982. **71**(2): p. 365-73.
102. Karlsson, M.C., A. Getahun, and B. Heyman, *FcγRIIB in IgG-mediated suppression of antibody responses: different impact in vivo and in vitro*. *J Immunol*, 2001. **167**(10): p. 5558-64.
103. Kim, D., et al., *Insights into the regulatory mechanism controlling the inhibition of vaccine-induced seroconversion by maternal antibodies*. *Blood*, 2011. **117**(23): p. 6143-51.
104. Kim, D. and S. Niewiesk, *Synergistic induction of interferon alpha through TLR-3 and TLR-9 agonists identifies CD21 as interferon alpha receptor for the B cell response*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(3): p. e1003233.
105. Kramer, T.T. and H.C. Cho, *Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hen's egg*. *Immunology*, 1970. **19**(1): p. 157-67.
106. Loeken, M.R. and T.F. Roth, *Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte*. *Immunology*, 1983. **49**(1): p. 21-8.
107. Hamal, K.R., et al., *Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens*. *Poult Sci*, 2006. **85**(8): p. 1364-72.

108. Patterson, R., et al., *The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen*. J Gen Physiol, 1962. **45**: p. 501-13.
109. Tressler, R.L. and T.F. Roth, *IgG receptors on the embryonic chick yolk sac*. J Biol Chem, 1987. **262**(32): p. 15406-12.
110. West, A.P., Jr., A.B. Herr, and P.J. Bjorkman, *The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog*. Immunity, 2004. **20**(5): p. 601-10.
111. Digangi, B.A., et al., *Effects of maternally-derived antibodies on serologic responses to vaccination in kittens*. J Feline Med Surg, 2012. **14**(2): p. 118-23.
112. Iida, H., et al., *[Effect of maternally derived antibody levels on antibody responses to canine parvovirus, canine distemper virus and infectious canine hepatitis virus after vaccinations in beagle puppies]*. Jikken Dobutsu, 1990. **39**(1): p. 9-19.
113. Markowska-Daniel, I., M. Pomorska-Mol, and Z. Pejsak, *The influence of age and maternal antibodies on the postvaccinal response against swine influenza viruses in pigs*. Vet Immunol Immunopathol, 2011. **142**(1-2): p. 81-6.
114. Koch, M.A., et al., *Maternal IgG and IgA Antibodies Dampen Mucosal T Helper Cell Responses in Early Life*. Cell, 2016. **165**(4): p. 827-41.
115. Hooijkaas, H., et al., *Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet*. Eur J Immunol, 1984. **14**(12): p. 1127-30.
116. Mendicino, M., et al., *Generation of antibody- and B cell-deficient pigs by targeted disruption of the J-region gene segment of the heavy chain locus*. Transgenic Res, 2011. **20**(3): p. 625-41.
117. Wen, K., et al., *B-Cell-Deficient and CD8 T-Cell-Depleted Gnotobiotic Pigs for the Study of Human Rotavirus Vaccine-Induced Protective Immune Responses*. Viral Immunol, 2016. **29**(2): p. 112-27.
118. Kaspers, B., *Ivestigations on the transfer of maternal immunoglobulins and the ontogenesis of immunoglobulin synthesis in the domestic chicken*, in *Veterinärwissenschaftliches Department*. 1989, Ludwig-Maximilians-Universität.
119. Sayegh, C.E., M.A. Rao, and M.J. Ratcliffe, *Avian B cell development: lessons from transgenic models*. Vet Immunol Immunopathol, 1999. **72**(1-2): p. 31-7.
120. Ching, K.H., et al., *Chickens with humanized immunoglobulin genes generate antibodies with high affinity and broad epitope coverage to conserved targets*. MAbs, 2018. **10**(1): p. 71-80.
121. Toung, J.M., et al., *RNA-sequence analysis of human B-cells*. Genome Res,

2011. **21**(6): p. 991-8.
122. Schmieder, S., *Transkriptomische Analyse der Bursa Fabricii des Huhns zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten*, in *Veterinärwissenschaftliches Department*. 2011, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
123. Namen, A.E., et al., *Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7*. *Nature*, 1988. **333**(6173): p. 571-3.
124. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(1): p. 57-63.
125. Zhao, S., et al., *Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e78644.
126. Sinha, R.K. and R.G. Mage, *Developing neonatal rabbit appendix, a primary lymphoid organ, is seeded by immature blood-borne B cells: evidence for roles for CD62L/PNAd, CCR7/CCL21, alpha4beta1 and LFA-1*. *Dev Comp Immunol*, 2004. **28**(7-8): p. 829-41.
127. Warren, W.C., et al., *A New Chicken Genome Assembly Provides Insight into Avian Genome Structure*. *G3 (Bethesda)*, 2017. **7**(1): p. 109-117.
128. Fitzsimmons, R.C., E.M. Garrod, and I. Garnett, *Immunological responses following early embryonic surgical bursectomy*. *Cell Immunol*, 1973. **9**(3): p. 377-83.
129. Ribatti, D., E. Crivellato, and A. Vacca, *The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage*. *Clin Exp Immunol*, 2006. **145**(1): p. 1-4.
130. Glick, B., T.S. Chang, and R.G. Jaap, *The Bursa of Fabricius and Antibody Production*. *Poultry Science*, 1956. **35**(1): p. 224-225.
131. Cooper, M.D., R.D. Peterson, and R.A. Good, *Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken*. *Nature*, 1965. **205**: p. 143-6.
132. Glick, B., *Morphological changes and humoral immunity in cyclophosphamide-treated chicks*. *Transplantation*, 1971. **11**(5): p. 433-9.
133. Ratcliffe, M.J. and J. Ivanyi, *Allotype suppression in the chicken. I. Generation of chronic suppression in heterozygous but not in homozygous chickens*. *Eur J Immunol*, 1979. **9**(11): p. 847-52.
134. Losch, U., et al., *Course of serum-Ig concentrations in B12 chickens of the UM line*. *Immunobiology*, 1981. **158**(5): p. 416-25.
135. Lebacqz-Verheyden, A.M., J.P. Vaerman, and J.F. Heremans, *Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions*. *Immunology*, 1974. **27**(4): p. 683-92.
136. Liu, J., et al., *Decreased IgA+ B cells population and IgA, IgG, IgM contents of the cecal tonsil induced by dietary high fluorine in broilers*. *Int J Environ Res Public Health*, 2013. **10**(5): p. 1775-85.

137. Berghof, T.V.L., et al., *Antigen-dependent effects of divergent selective breeding based on natural antibodies on specific humoral immune responses in chickens*. Vaccine, 2018. **36**(11): p. 1444-1452.
138. Sun, Y., et al., *Natural antibody isotypes as predictors of survival in laying hens*. Poult Sci, 2011. **90**(10): p. 2263-74.
139. Harris, J.R. and J. Markl, *Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review*. Micron, 1999. **30**(6): p. 597-623.
140. Letterio, J.J., et al., *Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice*. Science, 1994. **264**(5167): p. 1936-8.
141. Garofalo, R., et al., *Interleukin-10 in human milk*. Pediatr Res, 1995. **37**(4 Pt 1): p. 444-9.
142. Kimura, I., et al., *Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype in mice*. Science, 2020. **367**(6481): p. eaaw8429.
143. Andrews, S. *FastQC by Babraham Bioinformatics*. FastQC [cited 2020; Available from: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
144. Lefranc, M.P. *IMGT/HiV-QUEST*. [cited 2020; Available from: <https://www.imgt.org/HighV-QUEST/home.action>.
145. Alamyar, E., et al., *IMGT((R)) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS*. Methods Mol Biol, 2012. **882**: p. 569-604.

ANHANG

VERWENDETE CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Auflistung in Kapitel 4 - Material und Methoden - integriert.

- 1 Analytik Jena, Jena
- 2 AppliChem, Darmstadt
- 3 Biochrom, Berlin
- 4 BioLegend, San Diego, USA
- 5 Biomol, Hamburg
- 6 Bio-Rad Abd Serotec GmbH, Puchheim
- 7 Biozol, San Diego, USA
- 8 Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- 9 CLN GmbH, Freising
- 10 Cole-Parmer GmbH, Wertheim
- 11 Conrad Electronic, Hirschau
- 12 Eurofins, MWG, Ebersberg
- 13 Henry Schein, Melville, USA
- 14 Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., New Market, UK
- 15 Marmed, Cölbe
- 16 Medite, Burgdorf
- 17 Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
- 18 New England Biolabs, Ipswich, USA
- 19 Promega, Mannheim
- 20 Ratiopharm, Ulm
- 21 Sarstedt, Nümbrecht
- 22 Siepmann GmbH, Herdecke
- 23 Sigma-Adrich, Saint Louis, USA
- 24 Solis Biodyne, Tartu, Estland
- 25 Southern Biotechnologies Inc., Birmingham, USA
- 26 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- 27 Tobias Caratiola, München
- 28 VWR Internation GmbH, Darmstadt

- 29 Westfalen AG, Münster
- 30 Zefa, Harthausen
- 31 Vector Laboratories, Bulingame, USA
- 32 4titude, Wotton, UK

LABORGERÄTE IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE

Instrument	Typ	Hersteller
Autoklav	Vaculab HP 969-1HL	MMM Group, Planegg
Durchflussszytometer	Accuri C6	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Durchflussszytometer	Attune NxT	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dremel ®	Dremel 3000-15 ®	Dremel, Racine, USA
Feinwaage	Denver P214	Sartorius AG, Göttingen
Flockeneisbereiter	Manitowoc RF026	Mantiowoc, Wisconsin, USA
Gel Dokumentation	Quantum ST5	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gel Dokumentation Software	Quantum Vision Capt	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Homogenisator	SpeedMill Plus	Analytik Jena GmbH, Jena
Kryotom	CryoStar NX70	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer	VMS Advanced	VWR International GmbH, Darmstadt
Mikrowelle	-	MDA, Rüsselsheim
Mikroskop	PreciPoint M8	PreciPoint, Freising
Mikrozentrifuge	Perfect Spin Mini	Peqlab GmbH, Erlangen
Multikanalpipette 1-10 µl	Pipetman G12X10	Gilson, Middleton, USA
Multikanalpipette 20-200 µl	Pipetman G12X200	Gilson, Middleton, USA
NanoDrop	NanoDrop Lite	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH Meter	CyberScan 510	EUtech Scientific, Aachen
Pipetten	Pipetman G Series	Gilson, Middleton, USA

Plattenphotometer	Omega FluoSTAR	BMG Labtech, Offenburg
Plattenwaschgerät	Asys ELISA Washer	Biochrom, Berlin
Power Supply zur Gelelektrophorese	Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories, München
Rührfische	Verschiedene Größen	VELP Scientifica, Usmate, ITA
Schierlampe	LED Schierlampe Powerlux	Siepmann GmbH, Herdecke
Schlupfbrüter	BSS 300/8203	Grumbach Brutgeräte GmbH, Asslar
Sicherheitswerkbank	HeraSafe HS 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermocycler	Modell T100	Bio-Rad Laboratories, München
Thermoschüttler	VWR Collection 444- 0272	VWR International GmbH, Darmstadt
Tierwaage	DE 6K0.5A	Kern & Sohn, Balingen
Tischinkubator	Modell-400	Siepmann GmbH, Herdecke
Vorbrüter	HEKA Favorit Olymp, Sonderanfertigung	HEKA Brutgeräte GmbH, Rietberg
Vortexer	ZX3	VELP Scientifica, Usmate, ITA
Waage	SE422	VWR International GmbH, Darmsatdt
Zählkammer	Zählkammer nach Neubauer	VWR International, GmbH Darmstadt
Zentrifuge	5424 R	Eppendorf
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf

DANKSAGUNG

Kurz und knapp: Die AG Schusser ist das Gelbe vom Ei! 😊

Mein Dank für diese Doktorarbeit gilt vielen Leuten, aber an erster Stelle Prof. Dr. Benjamin Schusser für die Betreuung und den bereitgestellten Arbeitsplatz. Sowohl im Praktikum als auch während der Doktorarbeit, konnte ich immer zu Dir kommen und mir in jeder Lage Rat holen. Durch den freundlichen und vertrauensvollen Umgang miteinander, konnten wir auch schwierigere Zeiten gut meistern und am Ende trotzdem gemeinsam lachen.

Mein Dank gilt in gleicher Weise Prof. Dr. Bernd Kaspers, der mich im Grunde an diese Doktorarbeitsstelle vermittelt hat. Für die fachliche Unterstützung und dann letztlich für die Möglichkeit des Einreichens der Doktorarbeit möchte ich mich herzlich bedanken. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Marina Kohn bedanken, die mir bei allen Fragen rund um Histoschnitte geholfen hat.

Ein weiterer Dank gilt den Herrn Lion Müller und Prof. Jan Baumbach für die Zusammenarbeit bei der Analyse des Antikörperrepertoires. Es hat mir Spaß gemacht, ein bisschen Programmierer-Luft zu schnuppern, aber ich war froh, als die Profis dann übernommen haben.

Die heimlichen Helden dieser Arbeit sind allerdings meine Kollegen – Dr. Hicham Sid, Romina Hellmich, Denise Bartsch und Kamila Lengyel - aber auch Theresa Thoma und Sabrina Schleibinger möchte ich hier erwähnen. Ich konnte in jeder erdenklichen Lage auf Euch zählen und ihr seid mir wirklich immer zur Seite gestanden. Wir haben im wahrsten Sinne Freud und Leid geteilt und ich hätte mir keine besseren Kollegen wünschen können!

Ich möchte mich auch herzlich bei Dr. Maria Laparidou bedanken, die mich eingearbeitet hat und mir sehr nützliche Tipps verraten hat. Ebenfalls erwähnen möchte ich Shen Yeng Tan, die mir sehr ans Herz gewachsen ist.

Eine sehr wertvolle Unterstützung erhielt ich von Helga Hagemann und Manuela Wanninger – unseren Tierpflegern in Thalhausen. Ihr seid wirklich Gold wert und ich danke Euch für Eure aufopferungsvolle Mitarbeit und das Schieben der Pause, wenn es mal wieder länger gedauert hat.

Ich würde mich auch sehr gerne bei jedem Einzelnen der AG Schnieke bedanken, mit denen wir inzwischen mehr als eine „Zaunnachbarschaft“ haben. Ich freue mich sehr, dass die Zusammenarbeit und auch der Zusammenhalt so gewachsen ist!

Erwähnen möchte ich hier auch Tanja Wlk und Nadine Fischer. Unsere Fahrgemeinschaft nach Freising hat nicht nur geholfen CO₂ zu sparen, sondern ich hatte auch Gleichgesinnte, denen ich bei der Heimfahrt vom Arbeitstag und den typischen Problemchen erzählen konnte.

Zwar hier ganz zuletzt aufgeführt, aber am wichtigsten für mich persönlich ist mein privates Umfeld. Mein Freund, mit dem ich während jeder Autofahrt Stunden telefoniert habe und der mich immer ertragen hat.

Meine Eltern, die mich bekocht haben und bei Tränen immer mit einem Taschentuch parat waren.

Meine Freunde und Geschwister, die sich oft nur die schlechten Geschichten anhören mussten – ich kann mich über die Maßen glücklich schätzen Euch alle zu haben! Danke!